



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par** *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

**Discipline ou spécialité :** *Sciences des Agroressources*

---

**Présentée et soutenue par** *Caroline RONDEL*

**Le** *17 février 2009*

**Titre :** *Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives*

---

### JURY

*Pr. Thierry BENVENU (Rapporteur)*

*Pr. Jean-Marie AUBRY (Rapporteur)*

*M. Jean-François BLANCO (Membre)*

*M. Michel DANA (Membre)*

*M. Zéphirin MOULOINGUI (Membre)*

*Melle Elisa ZENO (Membre)*

*Mme Isabelle ALRIC (Invité) et Mme Françoise SILVESTRE (Invité)*

---

**Ecole doctorale :** *Sciences de la Matière*

**Unité de recherche :** *UMR 1010*

**Directeur(s) de Thèse :** *Pr. Françoise Silvestre*



Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été menées essentiellement au laboratoire de Chimie Agroindustrielle, dirigé par Melle Marie-Elisabeth Borredon, sous la direction du Pr. Françoise Silvestre. Par ailleurs, les études RMN ont été réalisées sur la plate forme RMN du Laboratoire de Génie Chimique et celle de l'Université Paul Sabatier.

Monsieur le Professeur Jean-Marie Aubry et Monsieur le Professeur Thierry Benvegna, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs et d'avoir contribué à l'élargissement des horizons de ces travaux.

Madame Françoise Silvestre, je vous exprime mes sentiments les plus sincères pour avoir non seulement dirigé ces recherches, mais aussi pour votre enthousiasme, votre pédagogie, vos qualités humaines et votre grande disponibilité malgré un emploi du temps surchargé.

Madame Isabelle Alric, je vous remercie pour m'avoir fait bénéficier de vos conseils, en particulier en synthèse organique, et pour votre disponibilité.

Monsieur Jean-François Blanco, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir encadré ce travail, pour votre gentillesse et m'avoir formé en RMN et fait partager votre expérience de cet outil analytique.

Monsieur Mouloungui je tiens à vous remercier de m'avoir fait profiter de votre expérience au travers de tous vos conseils et d'avoir présidé ce jury de thèse.

Un grand merci à tous les quatre pour vos contributions complémentaires qui ont permis d'aboutir à cette thèse.

Tous mes remerciements vont également à Mademoiselle Elisa Zéno, du Centre Technique du Papier de Grenoble, pour sa collaboration dans la réalisation des essais dans le domaine du désencrage du papier et sa présence à cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Michel Dana, de la société Silab, pour sa présence lors de cette thèse et pour l'apport de sa vision en tant qu'acteur industriel dans le domaine des cosmétiques.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire qui, par leur gentillesse et leur disponibilité, ont rendu le quotidien de ces trois années de thèse agréable et chaleureux. Un grand merci à mes partenaires de bureau, de course à pied, de cafet pour votre sympathie et votre amitié.

Merci enfin à toutes les personnes qui ont contribué de différentes façons à la réalisation de ce travail.

# **SOMMAIRE**

## **INTRODUCTION GENERALE..... - 10 -**

## **CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE ..... - 16 -**

### **I.1. QU’EST-CE QU’UN TENSIOACTIF ? ..... - 16 -**

I.1.1. UN PEU D’HISTOIRE..... - 16 -

I.1.2. DEFINITION ..... - 16 -

I.1.3. CLASSIFICATION ..... - 17 -

I.1.3.1. Les tensioactifs non ioniques - 18 -

I.1.3.2. Les tensioactifs anioniques - 18 -

I.1.3.3. Les tensioactifs cationiques - 19 -

I.1.3.4. Les tensioactifs amphotères - 19 -

I.1.3.5. Les tensioactifs naturels - 20 -

I.1.4. LE MARCHE DES TENSIOACTIFS ..... - 21 -

### **I.2. LES TENSIOACTIFS A BASE D’ACIDES AMINES ..... - 24 -**

I.2.1. INTRODUCTION ..... - 24 -

I.2.2. BREF HISTORIQUE SUR LES TENSIOACTIFS A BASE D’ACIDES AMINES ..... - 24 -

I.2.3. OBTENTION DES TENSIOACTIFS A BASE D’ACIDES AMINES ..... - 25 -

I.2.3.1. Les acides  $N^{\alpha}$ -acylaminés - 27 -

I.2.3.2. Les acides  $N$ -alkylaminés - 30 -

I.2.3.3. Les acides aminés dérivés d’ $O^{\alpha}$ -ester et  $O^{\alpha}$ -amide - 31 -

I.2.3.4. Autres tensioactifs dérivés d’acides aminés - 31 -

I.2.3.5. Les tensioactifs obtenus à partir de mélanges d’acides aminés et de peptides - 33 -

I.2.3.6. Les tensioactifs cationiques obtenus à partir d’acides aminés - 34 -

I.2.4. LES PROPRIETES DES TENSIOACTIFS A BASE D’ACIDES  $N^{\alpha}$ -ACYLAMINES ..... - 37 -

I.2.4.1. Tension de surface et concentration micellaire critique - 38 -

I.2.4.2. Les propriétés moussantes - 44 -

I.2.4.3. Les propriétés émulsifiantes - 47 -

I.2.4.4. Les propriétés antimicrobiennes - 48 -

I.2.5. CONCLUSION ..... - 50 -

### **I.3. LES MELANGES DE TENSIOACTIFS..... - 51 -**

1.3.1. LA SYNERGIE DES MELANGES DE TENSIOACTIFS .....	- 51 -
1.3.1.1. Le paramètre d'interaction $\beta$ .....	- 51 -
1.3.1.2. Synergie dans la formation des micelles mixtes .....	- 52 -
1.3.1.3. Synergie de l'efficacité de la réduction de la tension de surface .....	- 53 -
1.3.2. LES MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES ET CATIONIQUES .....	- 55 -
1.3.2.1. La formation des complexes anioniques/cationiques .....	- 56 -
1.3.2.2. La synergie des mélanges de tensioactifs anioniques/cationiques .....	- 59 -
1.3.2.2.1. La tension de surface .....	- 59 -
1.3.2.2.2. Stabilité des micelles .....	- 60 -
1.3.3. CONCLUSION.....	- 62 -
<b>I.4. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 64 -</b>

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES..... - 74 -**

<b>II.1. MATERIEL .....</b>	<b>- 74 -</b>
<b>II.2. METHODES DE CARACTERISATIONS ET D'ANALYSES.....</b>	<b>- 75 -</b>
II.2.1. MESURES DE LA TENEUR EN PROTEINE PAR DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL.....	- 75 -
II.2.2. MESURES DE LA TENEUR EN MATIERE SECHE.....	- 75 -
II.2.3. MESURES DE LA TENEUR EN MATIERE MINERALE .....	- 76 -
II.2.4. DOSAGES DES FONCTIONS AMINES LIBRES PAR METHODE OPA .....	- 76 -
II.2.5. TENEUR EN LIPIDES EXTRACTIBLES A L'HEXANE.....	- 77 -
II.2.6. DOSAGE GRAVIMETRIQUE DES COMPOSES PARIETAUX .....	- 78 -
II.2.7. ANALYSES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE .....	- 78 -
II.2.8. ANALYSES PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE .....	- 79 -
<b>II.3. LES SYNTHESSES .....</b>	<b>- 79 -</b>
II.3.1. LES HYDROLYSES .....	- 79 -
II.3.1.1. Les hydrolyses chimiques .....	- 79 -

II.3.1.2. Les hydrolyses enzymatiques.....	- 79 -
II.3.2. LA <i>N</i> -ACYLATION .....	- 80 -
II.3.2.1. La <i>N</i> -acylation sur les acides aminés modèles.....	- 80 -
II.3.2.2. La <i>N</i> -acylation des peptides .....	- 80 -
II.3.3. L'ESTERIFICATION : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES .....	- 81 -
II.3.3.1. La cationisation des molécules modèles .....	- 81 -
II.3.3.1.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide de la choline .....	- 81 -
II.3.3.1.1.1. Estérification inspirée de Takayanagi et Endo (Takayanagi and Endo 1994).....	- 81 -
II.3.3.1.1.2. Estérification inspirée de Bergfeld and al. (Bergfeld and al. 1997) ....	- 81 -
II.3.3.1.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl <sub>2</sub> .....	- 82 -
II.3.3.1.2. L'estérification des fonctions carboxylates par le chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 82 -
II.3.3.1.2.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 82 -
II.3.3.1.2.2. L'estérification de l'acide N-acétylglutamique à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 83 -
II.3.3.2. La cationisation des formulations à base d'acides aminés.....	- 83 -
II.3.3.2.1. La cationisation des formulations à base des sels de sodium des acides N <sup>α</sup> -acylaminés.....	- 83 -
II.3.3.2.2. La cationisation des formulations à base des acides N <sup>α</sup> -acylaminés .....	- 83 -
II.3.3.3. La cationisation des formulations à base de peptides acylés .....	- 84 -
<b>II.4. MESURES DES PROPRIETES .....</b>	<b>- 85 -</b>
II.4.1. MESURES DE LA CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE (CMC) .....	- 85 -
II.4.2. MESURES DES PROPRIETES MOUSSANTES.....	- 86 -
II.4.3. MESURES DES PROPRIETES EMULSIONNANTES.....	- 86 -
II.4.4. DETERMINATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE.....	- 87 -
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 89 -</b>
 <b><u>CHAPITRE III : CARACTERISATION ET HYDROLYSE DE L'ISOLAT</u></b>	
<b><u>PROTEIQUE DE POIS.....</u></b>	<b><u>- 93 -</u></b>



<b>III.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>- 93 -</b>
<b>III.2. POURQUOI LES PROTEINES DE POIS ? .....</b>	<b>- 93 -</b>
III.2.1. LES CRITERES DE CHOIX.....	- 93 -
III.2.2. LES SOURCES PROTEIQUES .....	- 94 -
III.2.3. LES PROTEINES DE POIS .....	- 96 -
<b>III.3. CARACTERISATION DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE POIS .....</b>	<b>- 99 -</b>
III.3.1. COMPOSITION DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE POIS .....	- 99 -
III.3.2. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PROTEINE DE POIS.....	- 101 -
III.3.3. SOLUBILITE DES PROTEINES DE POIS .....	- 102 -
III.3.4. EVALUATION DE LA QUANTITE DE GROUPES AMINES LIBRES DANS LES PROTEINES ..	- 103 -
<b>III.4. L'HYDROLYSE DES PROTEINES DE POIS.....</b>	<b>- 104 -</b>
III.4.1. INTRODUCTION.....	- 104 -
III.4.2. L'HYDROLYSE TOTALE PAR CATALYSE ACIDE.....	- 106 -
III.4.3. L'HYDROLYSE PARTIELLE PAR CATALYSE ENZYMATIQUE .....	- 107 -
III.4.3.1. Etat de l'art de l'hydrolyse par catalyse enzymatique des protéines végétales-	107 -
III.4.3.2. Influence du mode d'agitation .....	- 113 -
III.4.3.3. Etude de la cinétique de la réaction .....	- 114 -
III.4.3.4. Influence du mode d'introduction des enzymes .....	- 116 -
III.4.3.5. Influence du ratio enzyme/substrat (E/S).....	- 117 -
III.4.3.6. Etude de la répétabilité de l'hydrolyse .....	- 120 -
<b>III.5. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>- 121 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 124 -</b>

## **CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE .....**

<b>IV.1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 131 -</b>
---------------------------------	----------------

<b>IV.2. LA N-ACYLATION SUIVANT LA REACTION DE SCHOTTEN-BAUMANN.....</b>	<b>- 132 -</b>
IV.2.1. MISE AU POINT DE LA REACTION DE <i>N</i> -ACYLATION DE SCHOTTEN-BAUMANN SUR DES ACIDES AMINES MODELES .....	- 132 -
IV.2.1.1. Choix des modèles.....	- 132 -
IV.2.1.2. Résultats et discussions .....	- 133 -
IV.2.1.2.1. Mise au point des conditions opératoires.....	- 133 -
IV.2.1.2.2. Généralisation de la <i>N</i> -acylation sur les acides aminés modèles.....	- 136 -
IV.2.1.2.3. Les étapes de purification .....	- 138 -
IV.2.1.2.4. Etude de la composition des mélanges finaux par spectrométrie RMN-140-	
IV.2.1.3. Conclusion.....	- 152 -
IV.2.2. LA <i>N</i> -ACYLATION DE L'HYDROLYSAT PROTEIQUE DE POIS .....	- 152 -
IV.2.2.1. Introduction .....	- 152 -
IV.2.2.2. Résultats et discussion.....	- 153 -
IV.2.2.3. Traitements des mélanges.....	- 154 -
IV.2.2.4. Conclusion.....	- 155 -
<b>IV.3. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES .....</b>	<b>- 155 -</b>
IV.3.1. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS OBTENUES PAR <i>N</i> -ACYLATION DES ACIDES AMINES MODELES .....	- 155 -
IV.3.1.1. Tension de surface (TS) et concentration micellaire critique (CMC) .....	- 155 -
IV.3.1.2. Les propriétés moussantes.....	- 159 -
IV.3.1.3. Conclusion.....	- 161 -
IV.3.2. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES OBTENUS A PARTIR DES PROTEINES DE POIS .....	- 162 -
IV.3.2.1. Tension de surface et concentration micellaire critique .....	- 162 -
IV.3.2.2. Les propriétés moussantes.....	- 165 -
IV.3.2.3. Les propriétés émulsifiantes.....	- 167 -
IV.3.2.4. Conclusion.....	- 170 -
<b>IV.4. CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>- 170 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 172 -</b>

**CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS  
CARBOXYLATES ..... - 178 -**

**V.1. INTRODUCTION ..... - 178 -**

**V.2. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE..... - 180 -**

V.2.1. INTRODUCTION ..... - 180 -

V.2.2. UTILISATION DU CHLORURE DE CHOLINE ..... - 181 -

V.2.3. UTILISATION DU CHLORURE DU GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM..... - 182 -

V.2.4. UTILISATION DU CHLORURE DE 3-HALO-2-HYDROXYPROPYLTRIALKYL-AMMONIUM - 184 -

**V.3. GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES DE  
MOLECULES MODELES..... - 184 -**

V.3.1. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ESTERIFICATION DE L'ACIDE DODECANOÏQUE AVEC LA  
CHOLINE ..... - 184 -

V.3.1.1. Estérification selon les travaux de Takayanagi and Endo ..... - 186 -

V.3.1.2. Estérification selon les travaux de Bergfeld and al..... - 187 -

V.3.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub> ..... - 187 -

V.3.1.4. Conclusion ..... - 187 -

V.3.2. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ESTERIFICATION DE L'ACIDE DODECANOÏQUE AVEC LE  
CHLORURE DE GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM ..... - 188 -

V.3.2.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction en spectroscopie IR et RMN.. - 189 -

V.3.2.2. Résultats et discussion ..... - 192 -

V.3.2.2.1. Influence du mode d'introduction du GTA..... - 192 -

V.3.2.2.2. Influence de la présence de catalyseur ..... - 193 -

V.3.2.2.3. Influence de la quantité de GTA ..... - 193 -

V.3.2.2.4. Influence du temps de réaction ..... - 194 -

V.3.2.2.5. Influence de la nature du solvant ..... - 194 -

V.3.3. RESULTATS ET DISCUSSION DE LA CATIONISATION DE L'ACIDE *N*-ACETYLGLUTAMIQUE  
AVEC LE CHLORURE DE GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM..... - 195 -

V.3.3.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction par spectrométrie IR et RMN - 197 -

V.3.3.2. Résultats et discussion des synthèses..... - 200 -

V.3.3.3. Conclusion ..... - 202 -

<b>V.4. LA CATIONISATION DES FORMULATIONS DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES ISSUES DES PROTEINES DE POIS .....</b>	<b>- 203 -</b>
V.4.1. DEMARCHE EXPERIMENTALE .....	- 203 -
V.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION .....	- 204 -
V.4.3. CONCLUSION .....	- 209 -
<b>V.5. PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS OBTENUES APRES CATIONISATION ...</b>	<b>- 210 -</b>
V.5.1. TENSION DE SURFACE ET CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE.....	- 210 -
V.5.2. PROPRIETES MOUSSANTES .....	- 211 -
V.5.3. PROPRIETES EMULSIFIANTES.....	- 213 -
<b>V.6. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>- 215 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 218 -</b>
 <b><u>CONCLUSION GENERALE.....</u></b>	<b><u>- 222 -</u></b>
 <b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>- 228 -</u></b>
 <b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>- 241 -</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

La consommation annuelle mondiale de tensioactifs représente aujourd'hui 12 millions de tonnes, dont environ 3 millions pour l'Europe, ce qui représente un chiffre d'affaire mondial de 13 milliards d'euros. 75 à 80% de ces composés amphiphiles sont issus de la pétrochimie. Il s'avère que dans un contexte de développement durable et en réponse à la mise en place actuelle de la réglementation REACH, de nouveaux tensioactifs sont à développer à partir de matières premières naturelles renouvelables. Les prévisions de leur consommation incitent un accroissement significatif de leur production. Pour satisfaire cette demande, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules amphiphiles répondant aux nouveaux besoins et exigences des industriels, produits performants à coût réduit, et des consommateurs, produits écoresponsables ayant un impact réduit sur l'environnement.

Les biotensioactifs totalement naturels les plus développés actuellement sont ceux dérivés de sucres tels que les alkylpolyglucosides (APG). Du fait de la source de la partie hydrophile, ces derniers sont principalement des tensioactifs non ioniques. Nous souhaitons donc développer des tensioactifs ioniques issus de matières naturelles renouvelables.

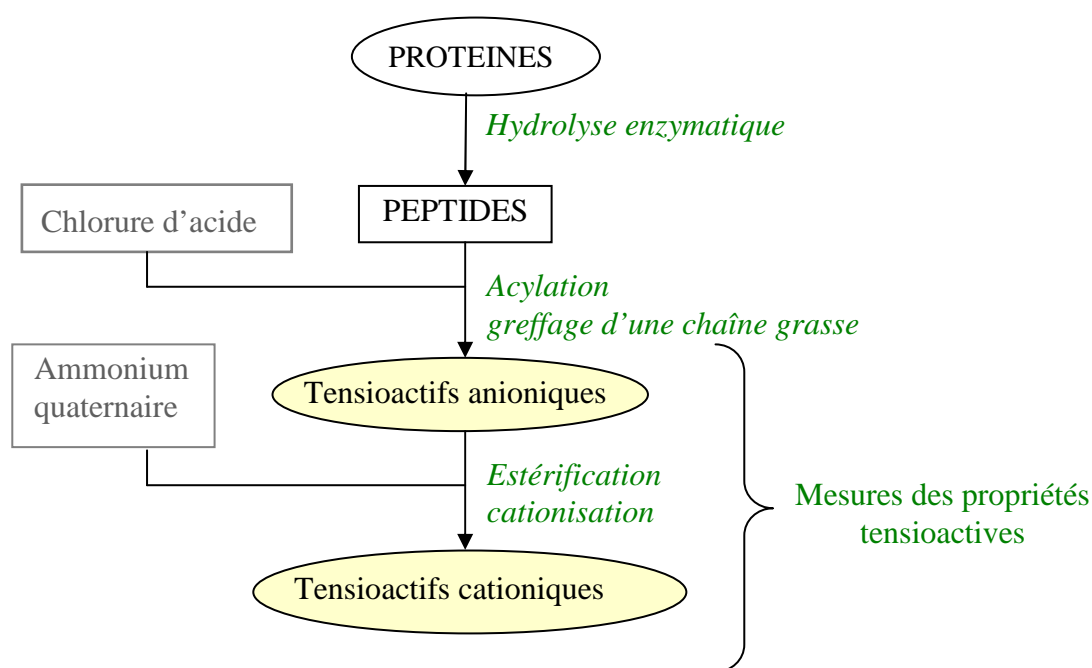
Jusqu'à maintenant, l'intérêt porté aux tensioactifs élaborés à partir d'acides aminés reste limité. Les principaux tensioactifs issus de protéines et d'acides aminés, tels que les *N*-acylglutamates et les *N*-acylsarcosinates de sodium sont essentiellement anioniques. Notre objectif est donc de développer de nouvelles formulations anioniques et cationiques à partir de protéines. Les mélanges obtenus doivent être caractérisés et leurs propriétés évaluées. A notre connaissance, aucune formulation cationique obtenue à partir de protéine et avec des procédés respectueux de l'environnement n'a été décrite dans la littérature. Or, les tensioactifs cationiques, en particulier ceux dérivés d'ammoniums quaternaires, possèdent des propriétés antibactériennes. Ils représentent donc une classe de tensioactifs intéressants pour des applications en cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire.

Pour développer de tels composés, nous avons mis en place une démarche de développement durable, en prenant en compte les aspects sanitaires et environnementaux des nouvelles molécules développées :

- tous les produits sont développés à partir de matières premières d'origine végétale et renouvelables qui sont sélectionnées en fonction de leur disponibilité, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur coût

- les procédés mis en œuvre pour fonctionnaliser les matières premières végétales respectent au mieux les principes de la chimie verte : <sup>(1)</sup>réduction des déchets, <sup>(2)</sup>conception de produits non toxiques, <sup>(3)</sup>utilisation de voies de synthèse moins nocives, <sup>(4)</sup>utilisation de ressources renouvelables, <sup>(5)</sup>utilisation d'un processus catalytique à la place de réactifs en proportion stoechiométrique, <sup>(6)</sup>réduction des dérivés chimiques, <sup>(7)</sup>respect de l'économie d'atomes, <sup>(8)</sup>utilisation de conditions opératoires et des solvants à impact sanitaire réduit, <sup>(9)</sup>amélioration des rendements énergétiques, <sup>(10)</sup>conception de produits biodégradables, <sup>(11)</sup>analyse des émissions en temps réel pour lutter contre la pollution, <sup>(12)</sup>réduction des risques d'accidents.

Notre objectif final est de mettre au point un procédé simple, efficace, peu coûteux et respectueux de l'environnement, dans le but d'obtenir des nouvelles molécules remplissant les conditions de REACH. Le présent travail, mené au Laboratoire de Chimie Agroindustrielle, est consacré à l'élaboration de nouveaux mélanges de tensioactifs à partir d'acides aminés ou d'un isolat protéique de pois. La Figure 1 schématise les principales étapes du procédé.



**Figure 1 : Etapes clés du développement de nouveaux mélanges de tensioactifs à partir d'un isolat protéique de pois**

Pour atteindre nos objectifs, nous avons mis en place la démarche scientifique suivante :

- Dans le premier chapitre, nous avons dressé un état des lieux relatif aux tensioactifs obtenus à partir d'acides aminés et de protéines. Les méthodes de synthèses de ces derniers sont explicitées, ainsi que leurs propriétés tensioactives. Enfin, nous avons également abordé le comportement des mélanges de tensioactifs anioniques et cationiques en solution.
- Le second chapitre est consacré aux descriptions des matériels, protocoles et méthodes utilisées pour réaliser les différentes synthèses, analyses et mesures de propriétés réalisées aux cours de ces travaux.
- Dans le troisième chapitre, nous avons justifié le choix de la matière première et nous avons caractérisé cette dernière. Un protocole d'hydrolyse enzymatique de l'isolat protéique de pois est optimisé afin d'obtenir la partie hydrophile des tensioactifs.
- Le quatrième chapitre a pour objectif le greffage de la chaîne lipophile conférant un caractère amphiphile aux lipopeptides obtenus. La réaction de *N*-acylation a été choisie pour introduire la chaîne alkyle. Celle-ci a été mise au point sur des acides aminés modèles avant d'être étendue aux hydrolysats protéiques. Le suivi des réactions est assuré par des techniques spectrométriques. Les propriétés tensioactives des mélanges de tensioactifs obtenus ont été évaluées et comparées à des tensioactifs de référence.
- Enfin, le dernier chapitre aborde la cationisation des formulations de tensioactifs obtenues dans le chapitre précédent, ainsi que l'évaluation des propriétés de ces nouveaux mélanges tensioactifs.



**CHAPITRE I :**  
**LES TENSIOACTIFS –**  
**ANALYSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....- 16 -**

<b>I.1. QU'EST-CE QU'UN TENSIOACTIF ?.....</b>	<b>- 16 -</b>
I.1.1. UN PEU D'HISTOIRE.....	- 16 -
I.1.2. DEFINITION.....	- 16 -
I.1.3. CLASSIFICATION.....	- 17 -
I.1.3.1. Les tensioactifs non ioniques	- 18 -
I.1.3.2. Les tensioactifs anioniques	- 18 -
I.1.3.3. Les tensioactifs cationiques	- 19 -
I.1.3.4. Les tensioactifs amphotères	- 19 -
I.1.3.5. Les tensioactifs naturels	- 20 -
I.1.4. LE MARCHE DES TENSIOACTIFS.....	- 21 -
<b>I.2.LES TENSIOACTIFS A BASE D'ACIDES AMINES .....</b>	<b>- 24 -</b>
I.2.1. INTRODUCTION.....	- 24 -
I.2.2. BREF HISTORIQUE SUR LES TENSIOACTIFS A BASE D'ACIDES AMINES .....	- 24 -
I.2.3. OBTENTION DES TENSIOACTIFS A BASE D'ACIDES AMINES.....	- 25 -
I.2.3.1. Les acides $N^{\alpha}$ -acylaminés	- 27 -
I.2.3.2. Les acides $N$ -alkylaminés	- 30 -
I.2.3.3. Les acides aminés dérivés d' $O^{\alpha}$ -ester et $O^{\alpha}$ -amide	- 31 -
I.2.3.4. Autres tensioactifs dérivés d'acides aminés	- 31 -
I.2.3.5. Les tensioactifs obtenus à partir de mélanges d'acides aminés et de peptides	- 33 -
I.2.3.6. Les tensioactifs cationiques obtenus à partir d'acides aminés	- 34 -
I.2.4. LES PROPRIETES DES TENSIOACTIFS A BASE D'ACIDES $N^{\alpha}$ -ACYLAMINES .....	- 37 -
I.2.4.1. Tension de surface et concentration micellaire critique	- 38 -
I.2.4.2. Les propriétés moussantes	- 44 -
I.2.4.3. Les propriétés émulsifiantes	- 47 -
I.2.4.4. Les propriétés antimicrobiennes	- 48 -
I.2.5. CONCLUSION .....	- 50 -
<b>I.3. LES MELANGES DE TENSIOACTIFS .....</b>	<b>- 51 -</b>
1.3.1. LA SYNERGIE DES MELANGES DE TENSIOACTIFS.....	- 51 -
1.3.1.1. Le paramètre d'interaction $\beta$	- 51 -
1.3.1.2. Synergie dans la formation des micelles mixtes	- 52 -
1.3.1.3. Synergie de l'efficacité de la réduction de la tension de surface	- 53 -

I.3.2. LES MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES ET CATIONIQUES .....	- 55 -
I.3.2.1. La formation des complexes anioniques/cationiques .....	- 56 -
I.3.2.2. La synergie des mélanges de tensioactifs anioniques/cationiques .....	- 59 -
I.3.2.2.1. La tension de surface .....	- 59 -
I.3.2.2.2. Stabilité des micelles .....	- 60 -
I.3.3. CONCLUSION .....	- 62 -
 I.4. CONCLUSION GENERALE.....	 - 62 -
 BIBLIOGRAPHIE .....	 - 64 -

## **CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

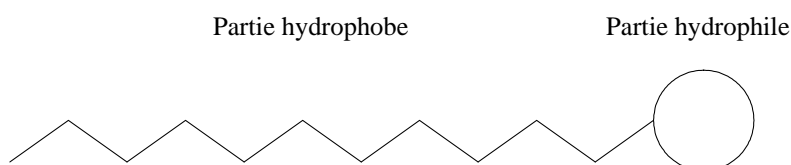
### **I.1. Qu'est-ce qu'un tensioactif ?**

#### **I.1.1. Un peu d'histoire...**

Parmi tous les tensioactifs que nous connaissons aujourd'hui, le plus ancien est le savon. Les premiers utilisateurs de savon auraient été les Sumériens en 2500 av. J.C. Ils fabriquaient les pains de savon à partir d'huiles végétales ou animales, de cendre d'os ou de bois et d'extraits de plantes parfumées. L'apparition du savon, tel que nous le connaissons aujourd'hui, aurait eu pour cadre la ville de Savone, en Italie, d'où il tire son nom. Pendant des siècles, le savon servait d'onguent, de cosmétique, de remède. Il faut attendre le Moyen-Age pour que le savon soit utilisé pour laver le linge. Il restera pendant longtemps un produit de luxe et deviendra accessible à toutes les bourses qu'au tournant du XX<sup>ème</sup> siècle. C'est en 1916 que le premier détergent complètement synthétique, le « Nekal a », fut créé en Allemagne (Mathis 1992). A partir des années 50, le savon se voit remplacé par des tensioactifs de synthèse dans les formulations détergentes (Noiret and al. 2002). Les tensioactifs, tels que nous les connaissons aujourd'hui, sont donc relativement récents.

#### **I.1.2. Définition**

Une molécule possède des propriétés tensioactives lorsqu'elle est constituée de deux parties de polarités différentes : l'une constituée d'une chaîne hydrocarbonée qui présente un caractère hydrophobe ou lipophile ; l'autre présente un caractère hydrophile et contient des hétéroatomes (O, P, S ou N) (Figure I-1).



**Figure I-1: Schéma d'une molécule tensioactive**

Les tensioactifs sont utilisés dans la plupart des actes de la vie courante. L'application la plus connue est la détergence. En 2001, l'Europe consommait 50% de sa production en tensioactifs pour des formulations de nettoyage ou de lavage. Mais leurs applications aujourd'hui ne se limitent pas à ceux-ci. On les retrouve dans de nombreux secteurs. Ainsi, la cosmétologie et l'hygiène corporelle représentent 10% de la production de tensioactifs. Par ailleurs, 40% des besoins sont liés au développement de secteurs industriels aussi variés que l'industrie textile, le forage et le raffinage du pétrole, les industries métallurgiques et minières, l'émulsification des bitumes, etc (Noiret and al. 2002). Des applications aussi diverses nécessitent une grande variété d'agents de surface. La nature et la structure des tensioactifs sont donc modulées en fonction de l'application visée.

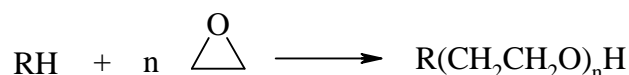
### **I.1.3. Classification**

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés en fonction

- **de la nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère) (Tableau I-1)**
- **de la longueur de la partie lipophile qui permet de classer les tensioactifs en agents mouillants ( $C_8$ - $C_{10}$ ), détergents ( $C_{12}$ - $C_{16}$ ), émulsionnants ou adoucissants ( $C_{18}$ - $C_{22}$ ) (Noiret and al. 2002)**
- **de leur origine, naturelle ou synthétique.**

### I.1.3.1. Les tensioactifs non ioniques

Ces agents de surface ne donnent aucun ion en solution aqueuse (Bonnevie 1998) . Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, de groupement polaire de type éther, alcool, carbonyle ou même amine. 90% de ces tensioactifs sont obtenus par polycondensation de molécules d'oxyde d'éthylène sur un composé à hydrogène mobile, selon la réaction générale :



Les autres produits tensioactifs non ioniques sont principalement :

- des esters de polyols : esters de sorbitanne, de glycérol, de polyglycérol, de sucre...
- des éthers de polyols : éthers de glucose
- des alcanolamines
- des alkylpolyglucosides (APG).

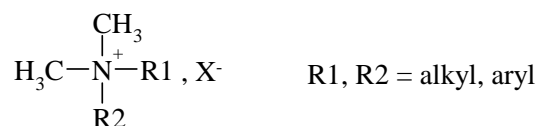
### I.1.3.2. Les tensioactifs anioniques

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions chargés négativement. Ces composés peuvent être subdivisés en trois principaux groupes (Larpen 1993) :

- les savons dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium d'un acide carboxylique
- les composés sulfonés de formule générale  $\text{RSO}_3^-\text{Na}^+$  qui constituent la première matière tensioactive la plus utilisée dans les formulations détergentes
- les composés sulfatés proviennent de la sulfatation d'un alcool. Ils ont un pouvoir moussant très élevé mis à profit dans la préparation des shampoings et des bains moussants. Les alcools gras sulfatés ont pour formule générale  $\text{ROSO}_3^-\text{Na}^+$ .

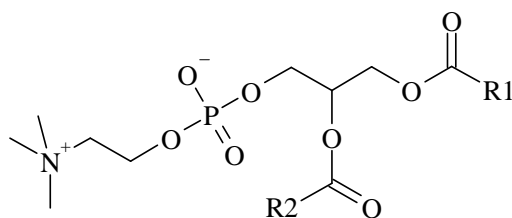
### I.1.3.3. Les tensioactifs cationiques

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupements s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions tensioactifs chargés positivement. Les plus répandus sont les dérivés des amines quaternaires aliphatiques de la forme :



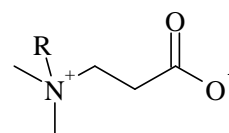
### I.1.3.4. Les tensioactifs amphotères

La recherche de nouveaux produits a naturellement conduit le chimiste à associer les charges anioniques et cationiques dans une seule et même espèce chimique appelée « zwitterionique ». Selon le pH, elles peuvent libérer un ion positif ou négatif. Les tensioactifs amphotères ont une balance hydrophile-lipophile (HLB) élevée. Ils sont donc utilisés comme détergents. Ils présentent un caractère moins agressif que les tensioactifs anioniques et sont recommandés pour les peaux fragiles. Les dérivés de la bétaine et les phospholipides sont les tensioactifs zwitterioniques les plus rencontrés (Figure I-2).



R1 et R2 : chaîne aliphatique

exemple de phospholipide



cétylbétaine

exemple de dérivé de la bétaine

**Figure I-2 : Exemples de tensioactifs amphotères**

	Exemples de tensioactifs	Principales propriétés et applications
Anioniques	savons ( $\text{RCOO}^-$ ) carboxylates ( $\text{RCO}_2^-$ ) sulfonates ( $\text{RSO}_3^-$ )	agents nettoyants (détergents) agents moussants
Non ioniques	éthoxylates polyols alkylpolyglucosides (APG)	émulsifiants mouillants non irritants (produits de soin de la peau)
Cationiques	amines ( $\text{R}_3\text{NH}^+$ ) ammoniums quaternaires ( $\text{R}_4\text{N}^+$ ) esters d'ammonium quaternaire	adoucissants textiles émulsionnants, bactéricides shampoings
Amphotères	bétaïnes phospholipides	moussants détergents peu irritants (hygiène corporelle)

Tableau I-1 : Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire

### I.1.3.5. Les tensioactifs naturels

Le terme de tensioactif naturel est ambigu. Pris au sens strict, un tensioactif naturel est issu de ressources naturelles. Cette source peut être d'origine animale ou végétale. Les tensioactifs naturels doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution. Aucun procédé de synthèse organique ne doit être réalisé. En réalité, il y a très peu de tensioactifs qui remplissent ces conditions. Les phospholipides, tels que les lécithines, obtenues à partir du soja ou du jaune d'œuf, sont les meilleurs exemples de tensioactif réellement naturel. Le facteur limitant la production de ces tensioactifs naturels est leur coût de production beaucoup plus élevé que celui des tensioactifs synthétiques aux propriétés équivalentes, car ces produits sont généralement présents en faibles quantités et les procédés de séparations sont laborieux.

**Les termes de tensioactif naturel et de biotensioactif sont donc souvent utilisés dans un sens plus large.** En effet, les tensioactifs synthétisés à partir de matière première naturelle sont généralement qualifiés de naturels. Ainsi un tensioactif dont l'une de ses parties, hydrophobe ou hydrophile, est obtenue à partir d'une source naturelle est appelé tensioactif



naturel ou biotensioactif. Par la suite, ces termes seront utilisés au sens large (Holmberg 2001).

Les principaux tensioactifs naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkylpolyglucosides (APG), les sucroesters et les alkylglucamides (Figure I-3) ; soit dérivés d'acides aminés. Les tensioactifs dérivés de polyol sont non ioniques, contrairement aux dérivés d'acides aminés.

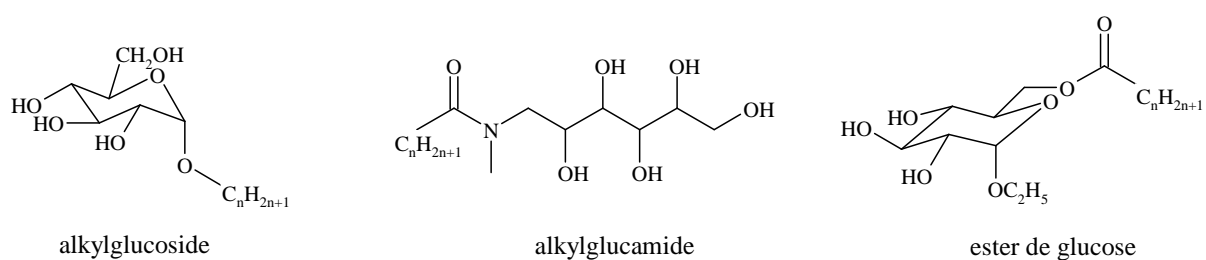


Figure I-3 : Exemples de tensioactifs à base de polyols

#### I.1.4. Le marché des tensioactifs

En 2007, toutes les applications des tensioactifs représentent, à travers le monde, une consommation de 11 millions de tonnes par an dont environ 3 millions pour l'Europe contre 2,6 millions de tonnes en 2002, ce qui représente une augmentation de 3% par an (Bognolo 2008). Les composés anioniques représentent la plus grande part de la production mondiale (Tableau I-2). Les tensioactifs non ioniques, sur le plan du tonnage, sont moins importants mais rassemblent une variété bien plus large d'espèces chimiques.

Classes	Volume de la production en Europe (10 <sup>3</sup> tonnes)	Pourcentage en Europe	Pourcentage dans le monde
Anioniques	970	40	>60
Non ioniques	1245	51	30
Cationiques	179	7	<10
Amphotères	57	2	
Total	2451	100	100

**Tableau I-2 : Répartition des différentes classes de tensioactifs en Europe et dans le monde en 1999**  
(ADEME 2001)

**En 2005, la consommation française de biotensioactifs est de l'ordre de 100 000 à 120 000 tonnes par an, avec une part de marché des biotensioactifs de 25 à 30%.** Deux secteurs consomment plus de 70% des biotensioactifs : le secteur de la détergence ménagère avec 42 000 tonnes, ce qui représente un taux de pénétration de 20 à 25% et celui des cosmétiques avec 35 000 tonnes, soit un taux de pénétration de 60 à 80% (Alcimed 2007).

Les APG représentent les tensioactifs à base de sucre les plus utilisés par les industries agrochimiques et la détergence. Ils sont produits à hauteur de 100 000 t/an, dont 50 000 t/an pour l'Europe. Ils constituent la gamme d'agents de surface glucidiques la mieux implantée sur le marché (Noiret and al. 2002). Cependant, ils ne représentent que 2% du marché européen des tensioactifs (Bognolo 2008).

Une étude prospective du marché français des tensioactifs et biotensioactifs a été menée pour l'ADEME (Alcimed 2007) (Tableau I-3). Cette étude a été élaborée selon un modèle basé sur quatre scénarios possible :

- **scénario 1, une continuité dans un contexte de stabilité** : un prix du baril stable, voire un tassement à 50-60 \$, dans l'hypothèse d'un apaisement géopolitique international et l'absence de catastrophe naturelle ; une pression sociétale en faveur des bioproduits sans changement véritable ; une intensité de la recherche sur les produits stable également
- **scénario 2, un contexte changeant mais sans prise de conscience sociale** : un contexte géopolitique plutôt conflictuel, le tarif du baril évoluant par ajustements *ad*

*hoc*, mais sans prise de conscience sociétale en ce qui concerne les bioproduits ; une recherche se mettant en place et se concentrant davantage sur les bioproduits

- **scénario 3, un essor des bioproduits** : un contexte géopolitique conflictuel, le tarif du baril évoluant par ajustement *ad hoc* : prise de conscience sociétale en ce qui concerne les bioproduits ; une recherche se mettant en place et se concentrant davantage sur les bioproduits
- **scénario 4, le pari d'un fort développement** : un contexte géopolitique très conflictuel entraînant une augmentation du prix du baril qui passerait à plus de 200 \$ en 2030 ; une pression sociétale pragmatique et s'exprimant clairement en faveur des bioproduits ; une mobilisation forte de la recherche, fortement axée sur les bioproduits, devenus prioritaires.

		scénario 1			scénario 2		scénario 3		scénario 4	
		2005	2015	2030	2015	2030	2015	2030	2015	2030
tensioactifs	quantités (kt)	400	420	441	420	441	400	380	400	380
biotensioactifs	quantités (kt)	110	122	135	140	163	173	208	214	277
	incorporation (%)	27,5	28,4	29,3	32,7	35,2	40,2	45,1	49,7	60,0

**Tableau I-3 : Marché français de la production de tensioactifs et son estimation en fonction des scénarios**

Quelque soit le scénario envisagé, on s'oriente, dans le futur, vers une augmentation importante de la production des biotensioactifs. Cette croissance des biotensioactifs est également due à :

- l'apparition d'une réglementation sur les produits chimiques de plus en plus contraignante (certification de type Ecolabel, Ecocert...)
- l'application du **nouveau règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques REACH** qui est entré en vigueur le 1er juin 2007
- **une demande croissante de développer une chimie durable**

- **une non acceptabilité par la société de plus en plus importante des produits non écocompatibles**

## **I.2. Les tensioactifs à base d'acides aminés**

### **I.2.1. Introduction**

**Les acides aminés et les petits peptides constituent une alternative intéressante aux sucres.** En effet, l'association d'un acide aminé ou d'un peptide polaire et d'un composé à longue chaîne non polaire, pour construire des structures amphiphiles, permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée (Infante and al. 1997; Infante and al. 2004). **Leurs propriétés permettent donc d'envisager leur utilisation dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, ménagers et alimentaires.** Ils sont dérivés d'acides aminés basiques, neutres ou acides ou d'hydrolysats de protéine. Les méthodes de préparations incluent des procédés chimiques, enzymatiques et chemo-enzymatiques, avec un net avantage pour les procédés chimiques, en raison de leur coût de production relativement faible.

### **I.2.2. Bref historique sur les tensioactifs à base d'acides aminés**

Les tensioactifs naturels peuvent être obtenus à partir de molécules qui miment les structures amphiphiles naturelles. Des recherches ont montré l'existence de lipides qui contiennent des acides aminés dans leur structure (Kameda and Toyoura 1952; Utino and al. 1957). Ils sont largement présents dans les plantes, animaux et microorganismes. De telles substances sont appelées acides lipoaminés ou lipopeptides.

Hentrich and al. ont breveté une première application des acylsarcosinates et acylaspartates comme tensioactifs pour la détergence, les shampoings, le dentifrice (Hentrich and al. 1930) (Tableau I-4). Depuis, de nombreux chercheurs ont étudié la synthèse et la physico-chimie des acides acylaminés.

Takehara and al. établissent un procédé économique pour la synthèse d'acylglutamate (Takehara and al. 1973) permettant la commercialisation de ce dernier en 1972. Une décade plus tard, un nouveau marché est établi au Japon pour les nettoyants doux (Saitou and Takehara 1978). Depuis de nombreux dérivés d'acides aminés tel que l'acylsarcosinate et l'acylméthyltaurate ont été utilisés pour des produits de soin de la personne. Les applications

de l'acylglutamate ont été étendues à presque tous les types d'applications de soin de la personne, en raison de son caractère doux fortement demandé. Les tensioactifs à base d'acides aminés développés à l'échelle industrielle sont principalement des tensioactifs anioniques (l'acylglutamate et l'acylsarcosinate). Ils existent également quelques tensioactifs amphotères (le cocylglycinate).

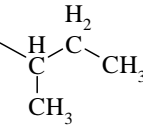
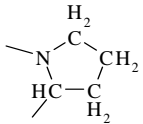
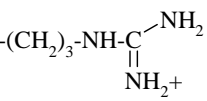
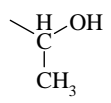
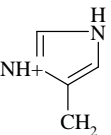
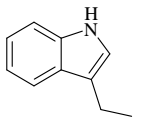
1909	premières recherches sur les acides $N^{\alpha}$ -acylaminés avec la synthèse du $N^{\alpha}$ -lauroylglycine et du $N^{\alpha}$ -lauroylalanine	(Bondi 1909)
1930	premier brevet d'application d'acides $N^{\alpha}$ -acylaminés	(Hentrich and al. 1930)
1955	première confirmation de l'existence naturelle des acides lipoaminés	(Cartwright 1955; Cartwright 1957)
1972	commercialisation de l'acylglutamate	

**Tableau I-4 : Dates clés du développement des tensioactifs à base d'acides aminés**

### **I.2.3. Obtention des tensioactifs à base d'acides aminés**

Il existe plus de 100 acides  $\alpha$ -aminés présents dans la nature, mais seuls **20 acides aminés résultent de l'hydrolyse des protéines** ou de peptides naturels. Ces 20 acides aminés sont les unités structurales de base des protéines (Tableau I-5).

# CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

acides aminés	symbole	chaînes latérales	pKa	pKb	pKr	pKi
alanine	A	-CH <sub>3</sub>	2,3	9,7	/	6,0
valine	V	-CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,3	9,6	/	6,0
isoleucine	I		2,4	9,7	/	6,1
leucine	L	-CH <sub>2</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,4	9,6	/	6,1
proline	P		2,0	10,6	/	6,3
méthionine	M	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>	2,3	9,2	/	5,8
phénylalanine	F	-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,8	9,1	/	5,5
acide aspartique	D	-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	2,2	9,8	3,9	3,0
acide glutamique	E	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	2,2	9,7	4,3	3,2
lysine	K	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	2,2	9,0	10,5	9,8
arginine	R		2,2	9,0	12,5	10,8
sérine	S	-CH <sub>2</sub> -OH	2,2	9,8	/	5,68
thréonine	T		2,6	10,4	/	5,7
tyrosine	Y	-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH	2,2	9,1	10,1	5,7
cystéine	C	-CH <sub>2</sub> -SH	1,7	10,8	8,3	5,0
asparagine	N	-CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>	2,0	8,8	/	5,4
glutamine	Q	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>	2,2	9,1	/	5,7
histidine	H		1,8	9,2	6,0	7,6
tryptophane	W		2,4	9,4	/	5,9

pKa : logarithme de la constante d'équilibre de la fonction acide carboxylique ; pKb : logarithme de la constante d'équilibre de la fonction amine ; pKr : logarithme de la constante d'équilibre de la fonction de la chaîne latérale de l'acide aminé ; pKi : point isoélectrique

**Tableau I-5 : Structures et pK des 20 acides aminés naturels présents dans les protéines (Stryer 1985)**

De part la multifonctionnalité des acides aminés et des peptides, la chaîne lipophile peut être greffée selon des mécanismes différents (acylation, estérification, alkylation ou amidation) (Figure I-4) (Infante and al. 1997).

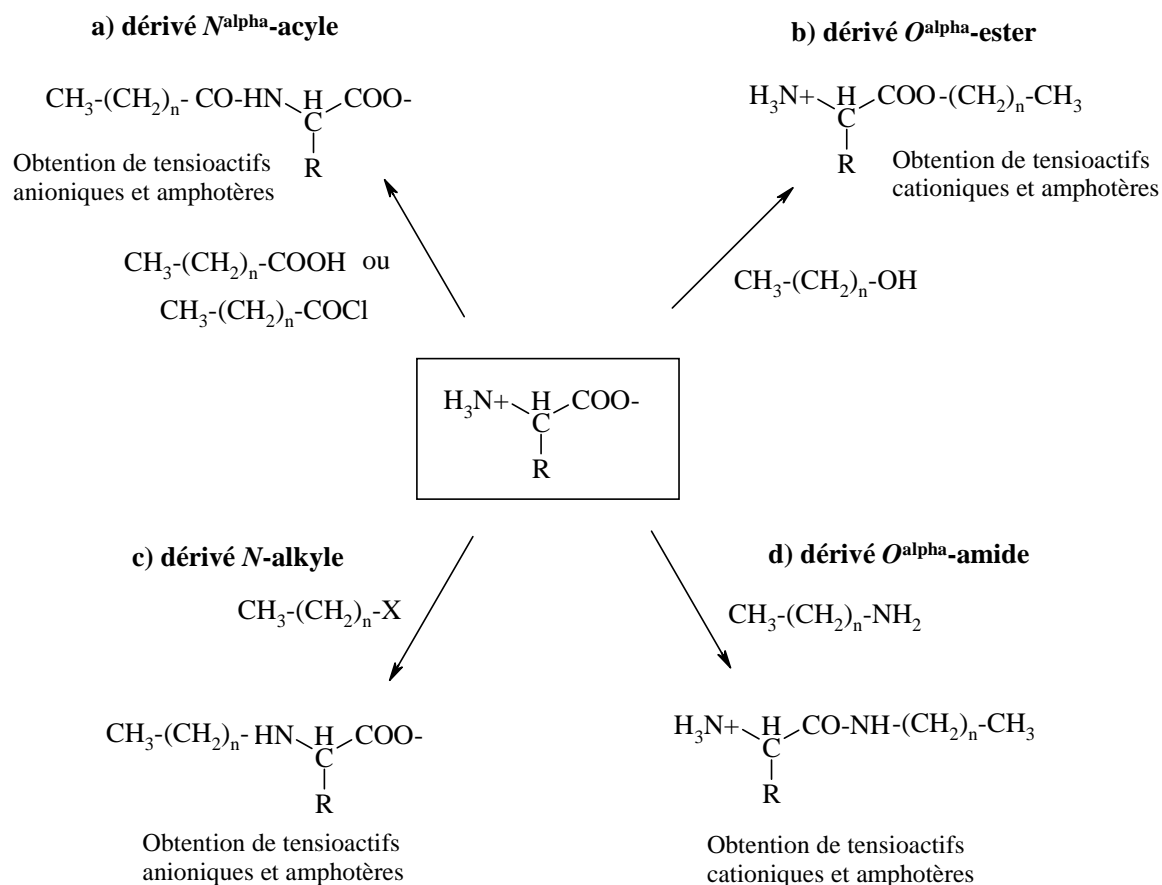


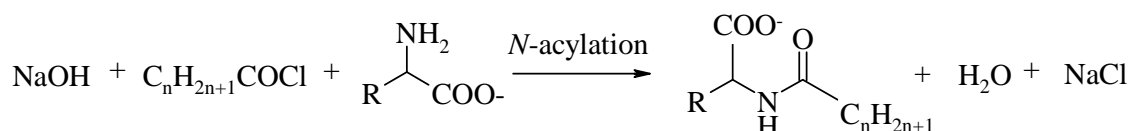
Figure I-4 : Les différents modes d'obtention de tensioactifs à base d'acides aminés (Infante and al. 1997)

### I.2.3.1. Les acides $N^{\alpha}$ -acylaminés

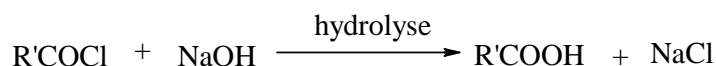
Les acides  $N^{\alpha}$ -acylaminés sont les plus rencontrés dans la littérature du fait de la réactivité plus élevée de la fonction amine sous forme basique par rapport à celle de la fonction carboxylate vis-à-vis des réactifs acyls. Il n'est donc pas nécessaire de protéger la fonction carboxylique pour acyler la fonction amine.

L'approche la plus simple pour la préparation d'acides  $N^{\alpha}$ -acylaminés à longue chaîne est basée sur l'utilisation d'un chlorure d'acide, dans une solution aqueuse alcaline qui

**contient les acides aminés.** Cette réaction a été introduite par **Schotten** (1844) et **Baumann** (1886) (Figure I-5). C'est l'approche la plus utilisée commercialement. Cependant, celle-ci entraîne également la formation d'alcanoate de sodium (Figure I-6). **Dans la littérature, la proportion de savon obtenu par rapport aux acides  $N^{\alpha}$ -acylaminés n'est pas précisée.**



**Figure I-5 : Réaction de  $N$ -acylation de Schotten-Baumann d'un acide aminé**



**Figure I-6 : Hydrolyse du chlorure d'acide en acide gras**

Ainsi, des acides aminés, tels que la glycine, la méthionine, la sérine, l'alanine, la phénylalanine, la sarcosine, la valine, la leucine, la lysine ont été acylés avec des chlorures d'acide de 8 à 18 atomes de carbone, selon la réaction de Schotten-Baumann, dans l'eau (Kester 1949; Jungermann and al. 1956; Iyer and al. 1982; George and al. 1998). Les  $N$ -acylations des acides glutamique et aspartique avec des chlorures d'acide de 12 à 18 carbones, en présence d'oxyde de magnésium, peuvent être réalisées dans des solvants tels que l'eau, avec un rendement de 33% (Takehara and al. 1972), l'éthanol ou l'éther éthylique (Kester 1949) ou des mélanges acétone/eau et dioxane/eau avec des rendements de 41 à 94% (Takehara and al. 1972; George and al. 1998).

La formation de dérivés  $N^{\alpha}$ -acylaminés possédant un caractère amphotère est réalisée en présence de chlorures d'acide et d'acides di- $\alpha,\epsilon$ -aminés, tels que la lysine ou l'arginine. L'arginine est une base extrêmement forte dans laquelle le groupement guanidine reste protonné dans les conditions de la  $N$ -acylation (Geiger and Köning 1981). En revanche, dans le cas de la lysine, la réaction de Schotten-Baumann conduit à la formation du tensioactif anionique  $N^{\alpha}$ ,  $N^{\epsilon}$ -diacyllysine (Takizawa 1973). Cependant, la différenciation entre les deux groupes amines est possible car le groupe amine de la chaîne latérale est plus basique. La



protection sélective de la fonction  $\epsilon$ -amine et la formation du  $N^\alpha$ -acyllysine est donc réalisable (Gryc and al. 1979). Les  $N^\epsilon$ -acyllysines sont préparés industriellement par déshydratation thermique d'un sel d'acide gras de lysine avec des rendements de l'ordre de 28% (Takizawa 1973) (Figure I-7).

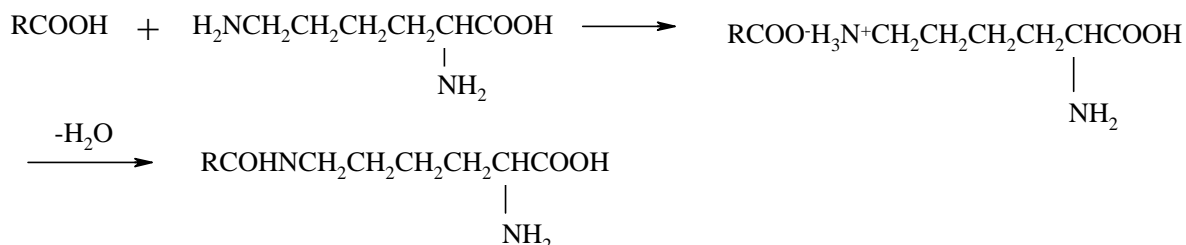


Figure I-7 : Obtention du  $N^\epsilon$ -acyllysine par déshydratation thermique d'un sel d'acides gras de lysine

Les  $N^\epsilon$ -acyllysines peuvent être également synthétisés par une lipase (Lipozyme) fixée sur une résine anionique microporeuse, à l'échelle du laboratoire, avec des rendements qui peuvent atteindre 73%, après 7 jours d'incubation, à 90°C (Montet and al. 1990).

La synthèse du  $N^\alpha$ -acylarginine ester d'alkyle a permis l'obtention de tensioactifs cationiques (voir paragraphe I.2.3.6.).

Les acides  $N^\alpha$ -acylaminés peuvent également être obtenus à partir d'anhydride. Les anhydrides d'acides gras symétriques peuvent être préparés à partir de l'acide gras correspondant, en utilisant différents réactifs incluant le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'aminolyse de l'anhydride symétrique est facile, mais le principal inconvénient de cette méthode est que seule la moitié de l'anhydride permet d'obtenir un acide  $N^\alpha$ -acylaminé (Figure I-8) (Boissonpaas 1951; Vaughan 1951).

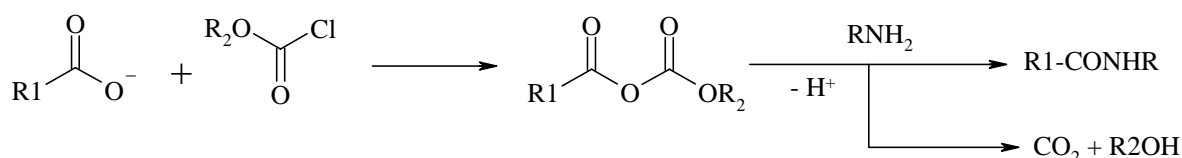


Figure I-8 : Obtention d'un acide  $N^\alpha$ -acylaminés par l'activation et le couplage d'un anhydride mixte

D'autres types de tensioactifs à base de dipeptides sont obtenus à partir de la condensation d'acides aminés purs ou d'hydrolysats de collagène sur le  $N^{\alpha}$ -lauroylarginine (Molinero and al. 1988). Ainsi, des  $N^{\alpha}$ -lauroylarginyl-lysine et des  $N^{\alpha}$ -lauroylarginyl-acide glutamique ont été préparés à l'aide de méthodes de synthèses peptidiques. Ces synthèses multiétapes utilisent des solvants organiques tels que du diméthylformamide (DMF), de l'isobutylchloroformiate (IBCIF) et de la  $N$ -méthylmorpholine (NMM) (Infante and al. 1992) (Figure I-9). De plus, en raison de la présence des quatre étapes de synthèse, les rendements globaux sont inférieurs à 30 et 40%, pour les dipeptides acylés à base d'acide glutamique et de lysine, respectivement.

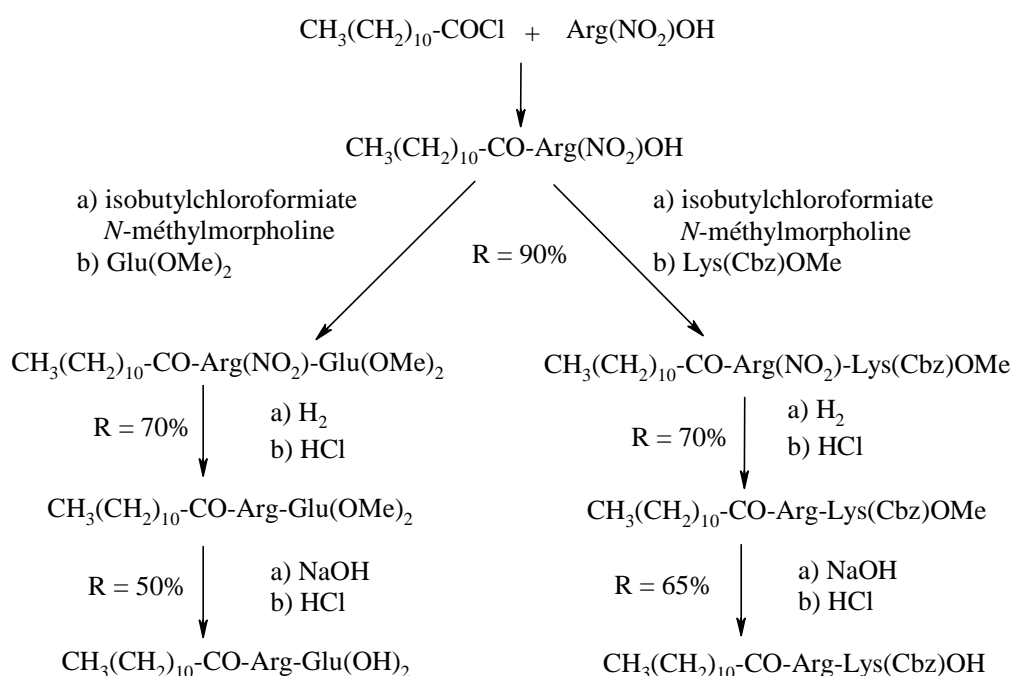


Figure I-9 : Synthèses des tensioactifs  $N^{\alpha}$ -lauroylarginine-lysine et  $N^{\alpha}$ -lauroylarginine-acide glutamique

### I.2.3.2. Les acides $N$ -alkylaminés

Les acides  $N$ -alkylaminés sont préparés quantitativement par la réaction d'un halogénure primaire, secondaire ou tertiaire à longue chaîne, dans le DMF (Sisido and al. 1984) ou par addition d'époxyalcanes sur un acide aminé, après protection du groupe carboxylate de ce dernier, dans l'éthanol, avec un rendement de 40% (Hidaka and al. 1984).

Le cocylglycinate de potassium est commercialisé sous le nom « Amilite GCK-12 », par Ajinimoto Company's. Il est utilisé dans l'industrie des détergents et des cosmétiques.

### **I.2.3.3. Les acides aminés dérivés d' $O^{\alpha}$ -ester et $O^{\alpha}$ -amide**

Ces tensioactifs sont préparés à partir d'alcools gras ou d'amines grasses pour les dérivés esters et amides, respectivement. Leur synthèse nécessite la protection de la fonction amine. La méthode de synthèse comprend plusieurs étapes, dont la protection et la déprotection de l'amine, par généralement un groupement tert-butyl-oxycarbonyl (Boc) ou carboxybenzyloxy (Cbz) (Infante and al. 2004) et l'activation de la fonction carboxylique de l'acide aminé par le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Gallot and Douy 1986).

L'estérification des acides aminés avec des alcools à courte chaîne est une réaction classique (Barett 1999). L'estérification en présence d'alcools à longue chaîne est plus difficile et nécessite l'activation de l'alcool. Ainsi, Selve and al. ont préparé des acides aminés et des peptides dérivés  $O^{\alpha}$ -ester avec du décanol activé par de l'acide p-toluène sulfonique, avec des rendements de 80 à 90% (Selve and al. 1992). Des alkylesters d'acide  $N^{\alpha}$ -acylaminés ont également été synthétisés à partir d'acide  $N^{\alpha}$ -acylaminés en présence de mésylate de cétyle et de bicarbonate de sodium, dans du DMF, à pression réduite, avec des rendements de 85% (Prabhudesai and Viswanathan 1979).

Le greffage d'acide gras peut aussi être réalisé par voie enzymatique, en utilisant des lipases en mode reverse (Roussel and al. 1997). Les lipases *Candida Antartica* et *Rhizomucor miehei* catalysent la réaction d'estérification d'acides  $N^{\alpha}$ -Cbz-aminés, en présence d'alcools gras, avec des rendements compris entre 68 et 94%, après 24 h de réaction. De même, la lipase *Candida Antartica* catalyse la condensation de l'acide *N*-Cbz-L-glutamique de diéthyle, avec le 1,10-décanediamine, avec un rendement de 80% (Valivety and al. 1998).

### **I.2.3.4. Autres tensioactifs dérivés d'acides aminés**

Il existe d'autres types de tensioactifs dérivés d'acides aminés tels les acides *O*-acylaminés (Figure I-10). Ces derniers sont développés à l'échelle du laboratoire. Ils sont dérivés de la sérine, via l'estérification du groupe hydroxyle de la chaîne latérale, par un acide gras. Ils ont donc une structure amphotère. Ce type de tensioactif est particulièrement attractif comme émulsifiant alimentaire, depuis que la synthèse peut être réalisée par voie enzymatique, en

utilisant des acides aminés et des alcools gras naturels. Les lipases *Candida cylindracea* et *Rhizopus delemar* catalysent la *O*-acylation de la sérine et de l'homosérine avec des acides gras libres ou des acides gras de triacylglycérol (Nagao and Kito 1989).

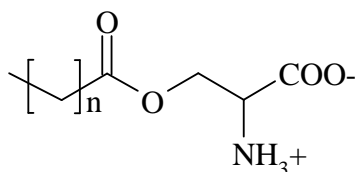


Figure I-10 : Structure d'un acide *O*-acylaminés dérivé de la sérine

Une autre série de tensioactif à base tryptophane a été synthétisée, par réaction de ce dernier avec l'adduit épichlorhydrine de l'alcool gras (Figure I-11) (Pegiaduo and al. 1999).

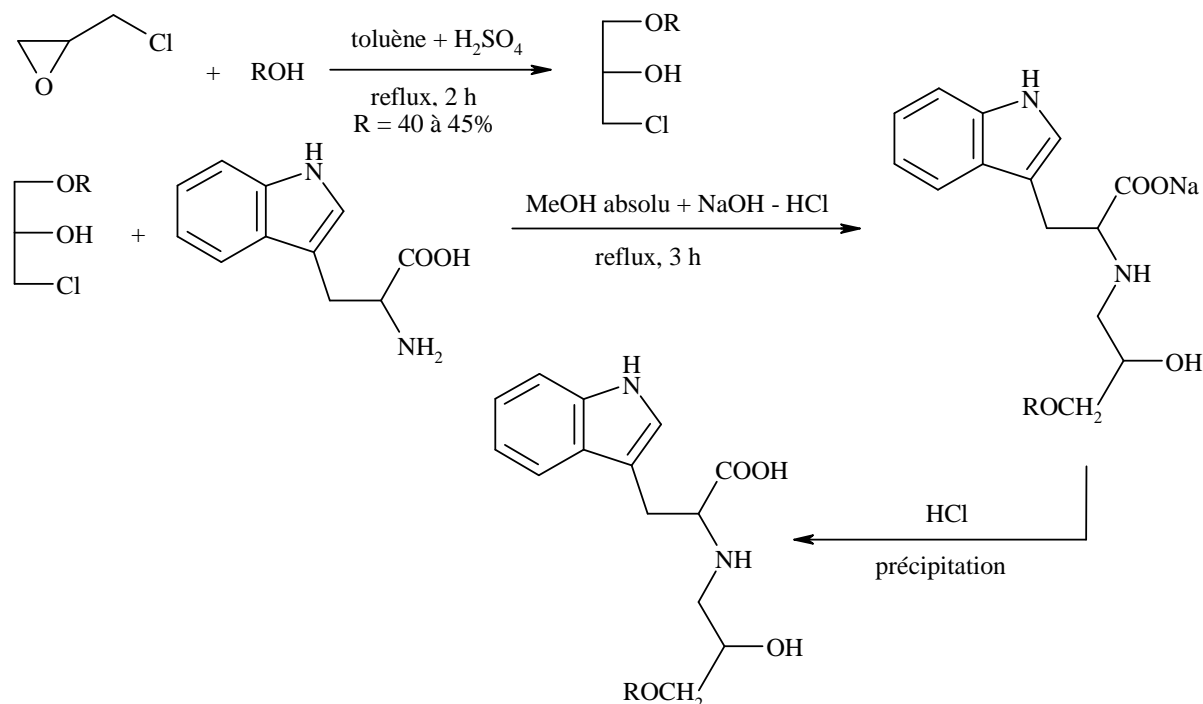


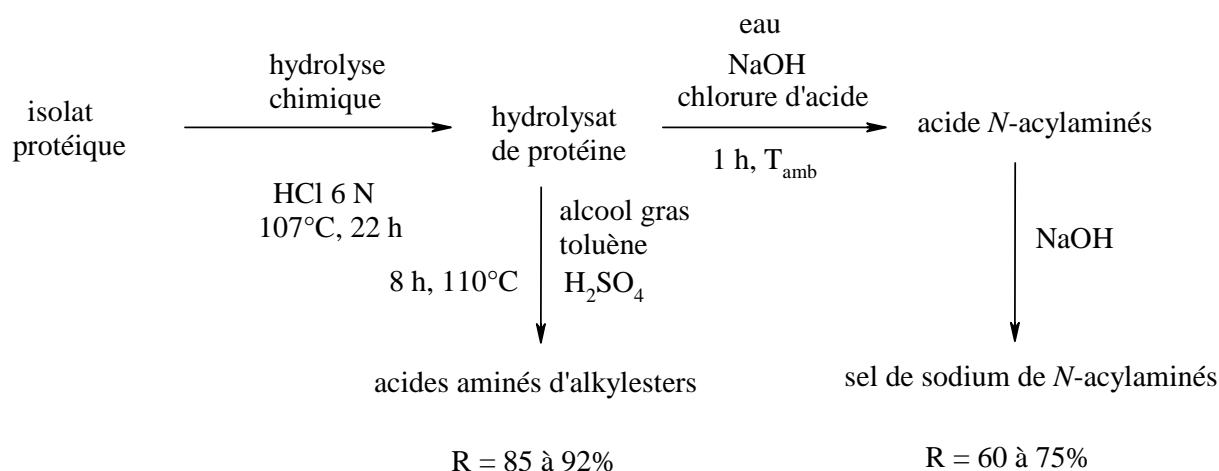
Figure I-11 : Voie de préparation d'un tensioactif à base tryptophane

### **I.2.3.5. Les tensioactifs obtenus à partir de mélanges d'acides aminés et de peptides**

La plupart des tensioactifs à base d'acides aminés sont produits à partir d'un hydrolysats de protéine, en raison de leur coût avantageux. Il existe de nombreuses sources protéiques disponibles, bons marchés, qui offrent des perspectives intéressantes pour la préparation d'hydrolysats. Les protéines issues de plantes, d'animaux, de déchets industriels représentent un véritable réservoir d'acides aminés.

Des recherches ont démontré la faisabilité de la conversion industrielle d'isolats protéiques en produits chimiques à valeurs ajoutées (Morelle 1969). De tels travaux montrent une conversion efficace de matières de base bons marchés et renouvelables, en de nouveaux produits à hautes valeurs ajoutées. Avant le début des années 90, les principales sources protéiques utilisées étaient des sources animales, telles que le collagène, l'élastine, la kératine, et la caséine. Pour des raisons liées à des risques de contamination par des pathogènes, ces sources protéiques sont actuellement évitées au bénéfice des protéines végétales. Les sources protéiques provenant de poissons et crustacés sont écartées, car ces dernières sont allergisantes.

Deux approches sont utilisées pour la synthèse de tensioactifs à base de mélange d'acides aminés (Figure I-12). L'une consiste, après hydrolyse acide totale des protéines, à faire réagir l'hydrolysats avec des chlorures d'acide gras, suivi d'une neutralisation avec de l'hydroxyde de sodium alcoolique (Morelle 1969; Berger and Gacon 1992). L'autre consiste à faire réagir l'hydrolysats protéique avec des alcools gras, dans un solvant organique, comme le toluène (Xia and al. 1996). Le principal inconvénient de la première méthode est que l'hydrolyse chimique requiert un apport d'énergie considérable, dû à une énergie d'activation élevée (chauffage à plus de 100°C pendant 22 h) et génère des produits secondaires. De même, l'estérification nécessite l'utilisation d'un solvant organique (le toluène) et un apport énergétique plus important (chauffage à 110°C pendant 8 h).



**Figure I-12 : Obtention de tensioactifs à base d'acides aminés à partir d'hydrolysat protéique**

(Xia and al. 1996)

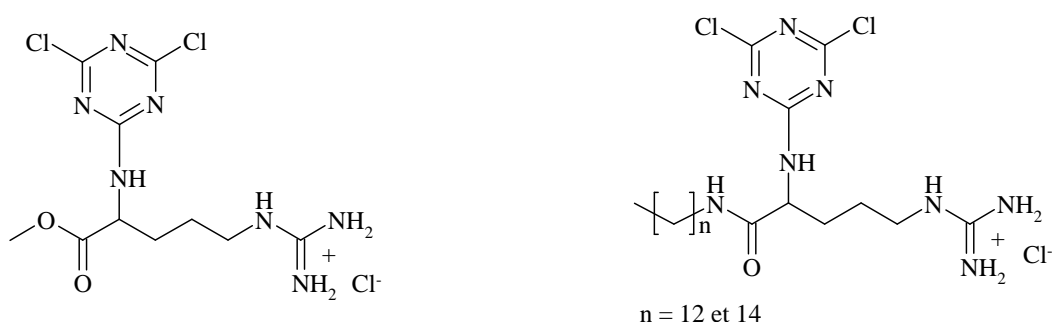
Une alternative à l'hydrolyse chimique des protéines consiste en une hydrolyse enzymatique partielle de ces dernières. Celle-ci requiert des conditions plus douces grâce à une baisse importante de l'énergie d'activation (voir chapitre III, paragraphe III.4.3.). Les peptides obtenus peuvent être ensuite acylés. Des mélanges de peptides acylés sont ainsi synthétisés à partir d'un hydrolysate de protéines de colza. Ce dernier est constitué de peptides comprenant en moyenne 5,4 acides aminés, obtenus grâce à l'hydrolyse des protéines de colza par l'Alcalase. Les peptides sont acylés suivant la réaction de Schotten-Baumann, dans l'eau, avec des chlorures d'acide de 6 à 16 carbones, avec des taux de conversion des fonctions amines libres de 68 à 94% (Sanchez-Vioque and al. 2001; Sanchez-Vioque and al. 2004).

#### **I.2.3.6. Les tensioactifs cationiques obtenus à partir d'acides aminés**

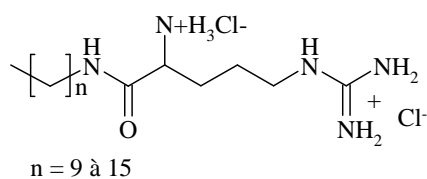
Les principaux tensioactifs cationiques à base d'acides aminés sont ceux dérivés de l'arginine. Ainsi, des  $N^{\alpha}$ -acylarginines esters de méthyle avec une longue chaîne de 8 à 14 carbones et des  $N^{\alpha}$ -lauroylarginines esters d'éthyle et de propyle sont obtenus avec des rendements de 65 à 80%. La synthèse est réalisée dans le DMF, en présence de triéthylamine, d'acide gras et de dicyclohexyl carbodiimide, durant 48 h, à température ambiante. A partir de ces composés cationiques, leurs homologues amphotères peuvent être obtenus par hydrolyse de la fonction ester, dans une solution alcoolique (50%) (Infante and al. 1984). Le chlorure de  $N^{\alpha}$ -lauroylarginine ester de méthyle est également synthétisé à partir de l'arginine ester de

méthyle, du dodécanol et du dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dans du DMF ou une émulsion huile dans eau, à température ambiante, en présence de triéthylamine, pendant 24 h, avec des taux de conversion compris entre 52 et 62% (Pinazo and al. 2000).

D'autres types de tensioactifs cationiques (Figure I-13) obtenus avec l'arginine sont synthétisés selon des synthèses multi-étapes nécessitant de nombreuses étapes de purifications (Piera and al. 1998). Un exemple de ces synthèses est donné Figure I-14.



monochlorure de *N*-dichlorotriazinylarginine ester de méthyle    monochlorure de *N*-dichlorotriazinyl arginylalkylamide



dichlorure d'arginylalkylamide

**Figure I-13 : Tensioactifs cationiques dérivés de l'arginine**

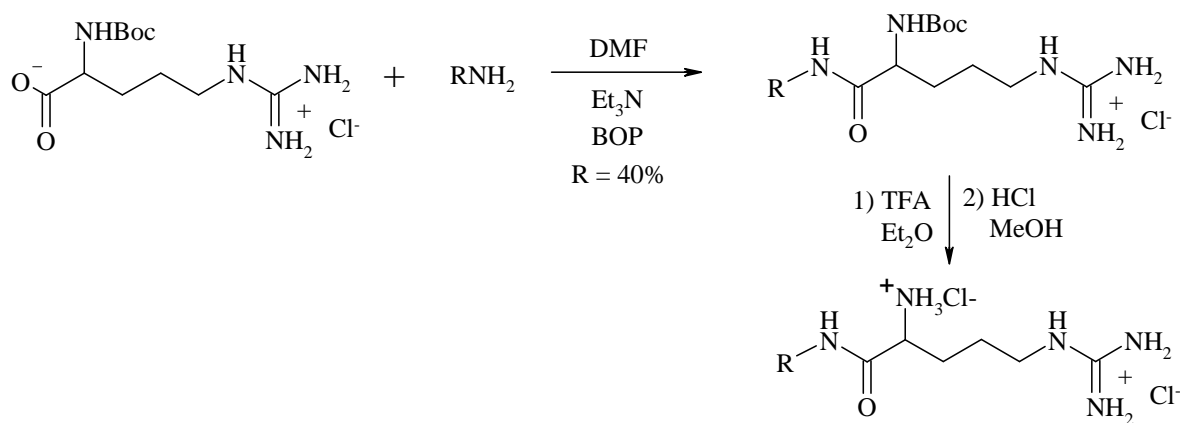


Figure I-14 : Synthèse du dichlorure d'arginylalkylamide

Les synthèses par voie enzymatique représentent une autre alternative intéressante pour obtenir des tensioactifs cationiques à partir de l'arginine. Ainsi, la papaïne est utilisée comme catalyseur de la formation des fonctions amide et ester entre Z-Arg-OMe et des amines et des alcools gras, respectivement. Z représente le groupe benzyloxycarbonyl, groupement protecteur de la fonction amine. Les meilleurs rendements (81 à 89%), pour l'obtention de dérivés d'arginine *N*-alkylamide, sont obtenus à 25°C, dans l'acétonitrile. Les synthèses de dérivés d'arginine ester d'alkyle sont réalisées, sans solvant, entre 50 et 65°C, avec des rendements de 86 à 89%. Les fonctions amines sont ensuite déprotégées. Les produits finaux ont une pureté de 53 à 78% (Clapes and al. 1999).

Des tensioactifs géminis cationiques à base d'arginine ont également été obtenus par voies chimique et enzymatique, avec des rendements de 51 à 65% (Perez and al. 1996; Piera and al. 2000).

D'autres tensioactifs cationiques sont obtenus à partir de la glycine bêtaïne, dont la structure est voisine de celle des acides aminés (Figure I-15) (Antoine and al. 2004). Des esters dérivés de la bêtaïne sont obtenus en faisant réagir la glycine bêtaïne, un acide sulfonique, un alcool gras qui est à la fois réactif et milieu, à 130-140°C, pendant 6 à 8 h, sous une pression de 50 à 100 mbar. Des amides dérivés de la glycine bêtaïne sont également obtenus selon une synthèse en deux étapes. La première étape consiste à faire réagir la glycine, en présence d'acide sulfonique et d'alcool gras qui est à la fois réactif et milieu, à 130-140°C, pendant 3 à 5 h, sous pression atmosphérique, afin d'obtenir l'ester butylique intermédiaire. La deuxième



étape, l'aminolyse, a lieu à 130°C, pendant 2 à 4 h, sous pression réduite, après ajout de l'amine grasse (50 à 100 mbar).

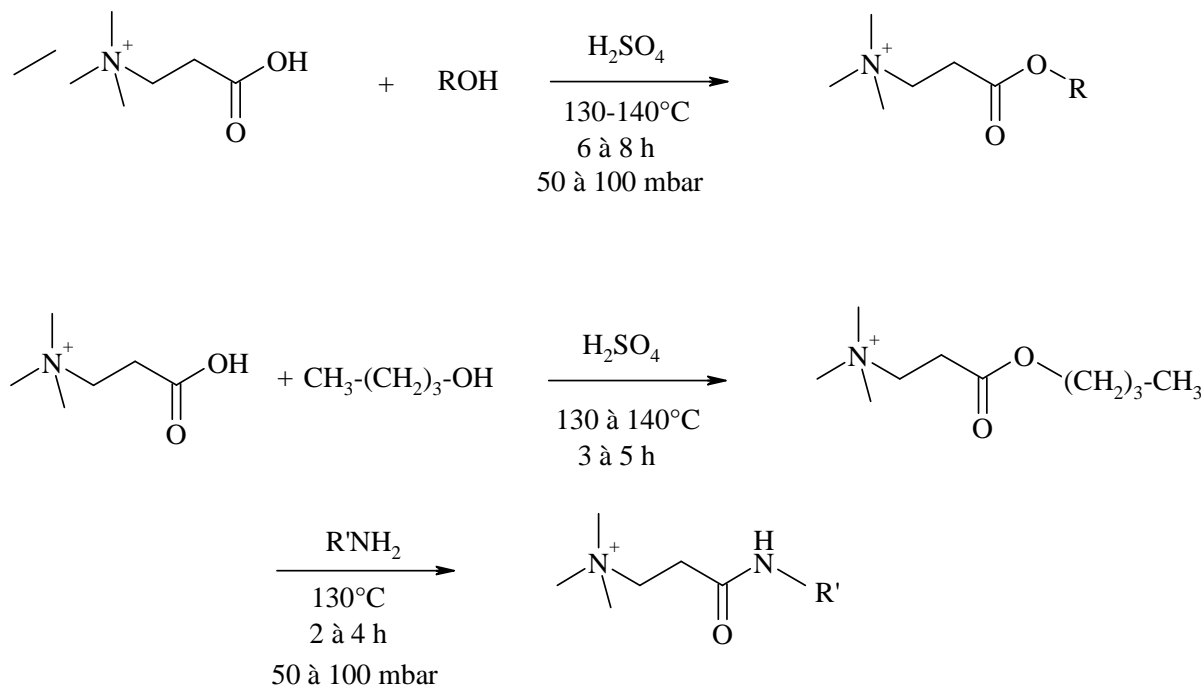


Figure I-15 : Obtention de dérivés esters et amides de la bétaine (Antoine and al. 2004)

Le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA) est utilisé dans l'eau pour quaterniser des protéines (Jawed and Manian 2002). Cependant, son utilisation sur des tensioactifs à base d'acides aminés a été peu décrite (voir chapitre V, paragraphe V.2.3.).

#### I.2.4. Les propriétés des tensioactifs à base d'acides $N^a$ -acylaminés

Un agent tensioactif permet d'abaisser les tensions de surfaces aux interfaces. L'efficacité d'un tensioactif peut être évaluée à travers plusieurs propriétés : la concentration micellaire critique (CMC), la tension de surface (TS), les propriétés moussantes, émulsifiantes... Toutes ces propriétés sont des conséquences, plus ou moins directes, de la diminution de la tension interfaciale et sont étudiées pour évaluer l'efficacité des tensioactifs et leurs applications potentielles.

#### **I.2.4.1. Tension de surface et concentration micellaire critique**

**La tension superficielle ou énergie de surface est la tension qui existe à l'interface de deux milieux. Les tensioactifs sont des composés qui permettent de diminuer cette tension de surface.** Lorsqu'un tensioactif est en solution, il vient s'adsorber à l'interface. Ce n'est qu'une fois celle-ci saturée que les molécules de tensioactifs vont former des micelles. On détermine ainsi la concentration micellaire critique (CMC). **Elle correspond à la concentration pour laquelle la tension de surface n'évolue pratiquement plus, malgré l'ajout de tensioactif.**

La CMC et la tension de surface de quelques acides  $N^{\alpha}$ -acylés obtenus à partir d'acides aminés purs et d'hydrolysats totaux de protéine et de peptides  $N^{\alpha}$ -acylés ont été mesurées. Le Tableau I-6 donne les CMC et la tension de surface à la CMC qui ont été déterminées pour des sels de sodium d'acides  $N^{\alpha}$ -acylaminés obtenus à partir de la sarcosine, l'alanine, la glycine, la sérine, la phénylalanine, la cystéine, la leucine et l'acide glutamique et aspartique. Les valeurs de CMC sont exprimées en mmol/L. **Celles de nos tensioactifs seront par la suite exprimées en mg/L, car il s'agit de mélanges et non de composés purs. Il a donc été nécessaire de convertir les valeurs de concentration molaire en concentration massique, afin de pouvoir comparer ces données avec nos résultats expérimentaux.**

# CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

	longueur de la chaîne hydrophobe	CMC (mmol/L)	CMC <sup>1</sup> (g/L)	TS (mN/m)	T (°C)	références
glycine	C8	166	37,2	41	40	(Desai and Bahadur 1992)
	C10	38	9,42	38,6	40	
	C12	10	2,81	37	40	
	C14	4,2	1,29	35,8	40	
	C16	0,17	0,057	33,5	40	
	C8	235	52,6	NC	25	(Heitmann 1968)
	C10	56	14,1	NC	25	
	C12	14,4	4,03	NC	25	
sarcosine	C8	181	34,8	NC	40	(Desai and Bahadur 1993)
	C10	10	2,66	NC	40	
	C12	17	5,00	NC	40	
	C14	4	1,29	30,2	40	
	C16	0,16	0,056	32	40	
alanine	C10	47,4	12,6	47,4	25	(Godtfredsen and Bjoerkling 1990)
	C12	6,98	2,05	42,5	25	
	C14	1,63	0,525	40,8	25	
	C16	NC	NC	42,4	25	(George and al. 1998)
	C16	0,158	0,055	27,2	40	
	C18	NC	NC	39	25	(Godtfredsen and Bjoerkling 1990)
acide aspartique	C16	0,18	0,075	24,2	40	(George and al. 1998)

NC : non communiqué

**Tableau I-6 : CMC et tension de surface à la CMC de sels de sodium d'acides *N*<sup>α</sup>-acylés**

<sup>1</sup> Valeurs calculées à partir de la concentration massique et de la masse molaire des sels de sodiums d'acides *N*<sup>α</sup>-acylaminés

# CHAPITRE I : LES TENSIOACTIFS – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

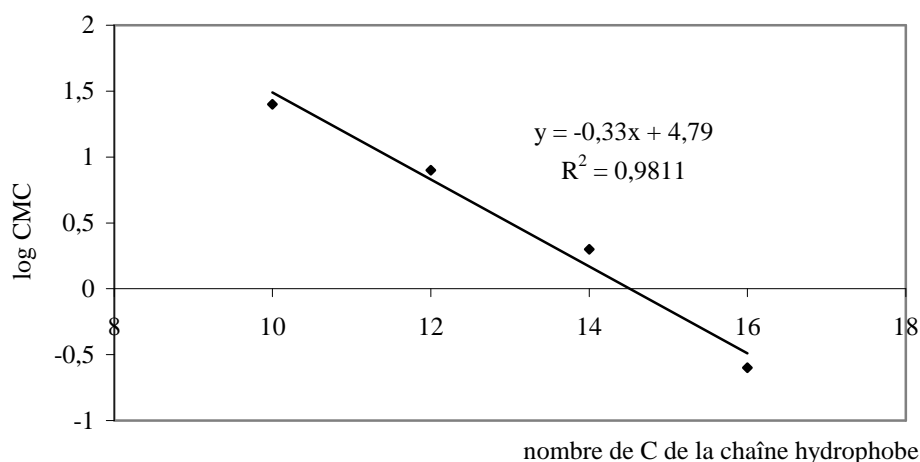
	longueur de la chaîne hydrophobe	CMC (mmol/L)	CMC <sup>1</sup> (g/L)	TS (mN/m)	T (°C)	références
leucine	C10	3,170	0,976	37,0	25	(Godtfredsen and Bjoerkling 1990)
	C12	2,28	0,766	34,0	25	
	C14	0,708	0,258	33,8	25	
	C16	NC	NC	35,5	25	
	C18	NC	NC	38,1	25	
phénylalanine	C10	5,7	1,77	36,9	25	(Godtfredsen and Bjoerkling 1990)
	C12	1,2	0,444	34,5	25	
	C14	0,404	0,161	38	25	
	C16	0,112	0,048	37,5	25	
	C18	0,163	0,074	36,9	25	
cystéine	C8	119	32,1	NC	25	(Heitmann 1968)
	C10	27	8,05	NC	25	
	C12	7,2	2,35	NC	25	
sérine	C10	60	16,9	NC	25	(Heitmann 1968)
	C12	13,8	4,28	NC	25	
	C14	3,6	1,22	NC	25	
acide glutamique	C12	0,9 ± 0,01	0,338	29,2 ± 1,2	25	(Xia and al. 1996)
	C14	0,8 ± 0,03	0,322	31,1 ± 1,0	25	
	C16	0,7 ± 0,01	0,302	32,0 ± 2,5	25	
	C18	0,6 ± 0,02	0,275	33,9 ± 1,9	25	
	C18:1	0,8 ± 0,03	0,366	30,3 ± 1,2	25	

NC : non communiqué

**Tableau I-6 (suite) : CMC et tension de surface à la CMC de sels de sodium d'acides N<sup>α</sup>-acylés**

<sup>1</sup> Valeurs calculées à partir de la concentration massique et de la masse molaire des sels de sodiums d'acides N<sup>α</sup>-acylaminés

**Pour une série d'acides aminés homologues, en règle générale, lorsque la longueur de la chaîne hydrophobe saturée augmente, la CMC diminue.** Cette relation a été montrée sur une série de  $N^{\alpha}$ -acylarginines esters de méthyle (Figure I-16) (Piera and al. 1998). Par ailleurs, **il semblerait que lorsqu'on ajoute une insaturation, la CMC augmente.** Pour une longueur de chaîne donnée, il n'a pas été établi de relation entre les valeurs de CMC et la nature de la partie hydrophile. Cela est d'autant plus délicat que, d'une part, toutes les valeurs de CMC pour chaque longueur de chaîne lipophile ne sont pas renseignées, d'autre part, toutes les mesures ne sont pas réalisées à la même température. On peut toutefois observer que les CMC les plus basses sont obtenues pour les tensioactifs avec une chaîne en C12 et C14, avec la phénylalanine, l'acide glutamique et la leucine. Ces derniers possèdent les chaînes latérales les plus encombrées. Les CMC les plus élevées sont obtenues pour la glycine et la sarcosine. Ces deux acides aminés possèdent un hydrogène comme chaîne latérale. Il semblerait donc que l'absence de chaîne latérale soit responsable de ces valeurs de CMC plus élevées, comparées à celles des autres sels de sodium de  $N^{\alpha}$ -acylaminés.



**Figure I-16 : Relation entre log CMC et le nombre de carbones de la chaîne latérale d'une série de  $N^{\alpha}$ -acylarginines esters de méthyle (Piera and al. 1998)**

**Il ne semble pas exister de relation entre les longueurs des chaînes hydrophobes et les valeurs de tension de surface.** En effet, pour les tensioactifs à base de glycine, la tension de surface diminue lorsque la longueur de la chaîne augmente, tandis que pour ceux à base de leucine, la tension de surface diminue du C10 au C14, puis augmente de C14 à C18. Pour les

*N*<sup>α</sup>-acylglutamate de sodium, la tension de surface est faiblement influencée par la longueur de la chaîne. Les TS les plus faibles sont obtenues pour les dérivés de l'acide glutamique (de 29,2 à 33,9 mN/m) et les plus élevées pour les dérivés de l'alanine (de 39 à 47,4 mN/m).

Des mesures de tension de surface ont également été réalisées sur des *N*<sup>α</sup>-acylarginine à la concentration maximale de leur solubilité (Infante and al. 1984) (Tableau I-7).

chaîne lipophile	C8	C10	C12
TS (mN/m)	43,4	35,5	43,8
concentration maximale de solubilité (mmol/L)	13	1	0,1

**Tableau I-7 : Tension de surface (TS) de *N*<sup>α</sup>-acylarginine déterminée à leur concentration maximale de solubilité (Infante and al. 1984)**

Des mesures de tension de surface et de CMC ont été réalisées sur des hydrolysats de protéines *N*-acylés, avec différents chlorures d'acide (de C10 à C18) (Tableau I-8).

source d'acides aminés	type d'hydrolyse	longueur de la chaîne grasse	CMC (mmol/L)	TS à la CMC (mN/m)	référence
protéines de graines de coton	chimique totale	C12	$2,8 \pm 0,02$	$29,5 \pm 2,2$	(Xia and al. 1996)
		C14	$0,8 \pm 0,03$	$33,2 \pm 1,9$	
		C16	$0,7 \pm 0,1$	$35,2 \pm 3,2$	
		C18	$0,5 \pm 0,01$	$39,8 \pm 2,6$	
		C18:1	$0,6 \pm 0,01$	$34,8 \pm 1,7$	
protéines de soie	chimique totale	C12	$1,5 \pm 0,1$	$28,0 \pm 1,7$	(Xia and al. 1996)
		C14	$0,6 \pm 0,01$	$31,2 \pm 1,3$	
		C16	$0,6 \pm 0,1$	$32,3 \pm 1,7$	
		C18	$0,4 \pm 0,01$	$34,0 \pm 2,2$	
		C18:1	$1,1 \pm 0,01$	$33,2 \pm 1,9$	
protéines de colza	enzymatique partielle (longueur moyenne des peptides = 5,4 acides aminés)	C10	NC	29,1	(Sanchez-Vioque and al. 2004)
		C12	NC	30,0	
		C14	NC	37,8	

**Tableau I-8 : CMC et tension de surface à la CMC de sels de sodium d'acides  $N^a$ -acylés obtenus à partir d'hydrolysats protéiques à 25°C**

Il est surprenant d'avoir les valeurs de CMC en concentration molaire, car dans le cas d'hydrolysats de protéines acylés, il s'agit de mélange et non de composés purs. Pour les protéines de graines de coton et de soie, l'hydrolyse chimique totale conduit à un mélange d'acides aminés. Les CMC observées dépendent donc de la composition du mélange.

**Tout comme avec les acides aminés purs acylés, pour une série d'hydrolysats de protéines homologues, la CMC diminue lorsque la longueur de la chaîne hydrophobe augmente. Pour les acides  $N^a$ -acylaminés issus d'hydrolysats de protéines, ce sont les molécules amphiphiles, avec une chaîne en C12, qui ont la meilleure capacité à réduire la tension de surface à l'interface eau/air.**

#### **I.2.4.2. Les propriétés moussantes**

**Les mousses sont des dispersions de gaz dans une phase continue fluide.** Elles peuvent être produites par introduction de bulles de gaz dans un liquide (bullage) mais, dans la majorité des cas, les mousses sont formées par battage. Dans ce cas, de larges bulles de gaz sont incorporées dans le liquide puis, elles sont fractionnées en bulles plus petites, par agitation violente. La formation des bulles, qui constituent la phase dispersée, engendre l'apparition d'une aire interfaciale importante, avec une tension superficielle élevée qui va tendre immédiatement à faire grossir les bulles, pour minimiser cette aire et donc, réduire l'énergie libre du système. La persistance des bulles n'est possible que si des agents tensioactifs s'adsorbent à l'interface liquide/air et abaissent ainsi la tension interfaciale. La formation de mousse requiert donc la présence d'agents tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air (Axelos and al. 2006).

**Pour une série de tensioactifs homologues, le pouvoir moussant passe par un maximum lorsque la longueur de la chaîne hydrocarbonée augmente** (Larpent 1993). La présence de ramifications sur la partie hydrophobe provoque une augmentation de la quantité de mousse, mais diminue la stabilité. Il est de même lorsque la tête hydrophile est déplacée d'une extrémité vers l'intérieure de la chaîne. Les tensioactifs linéaires sont, en général, de meilleurs agents moussants que les composés ramifiés. De même, les tensioactifs ioniques sont habituellement de meilleurs agents moussants que les tensioactifs non ioniques (volume et stabilité de mousse plus importants). Dans le cas des tensioactifs ioniques (anioniques ou cationiques), le pouvoir moussant est fonction de la solvation et donc, du contre-ion associé (cation ou anion).

La méthode la plus répandue pour la mesure du pouvoir moussant des détergents est celle de Ross et Miles (Ross and Miles 1941). Cependant, elle ne donne pas de renseignements utiles pour la structure des mousses. De plus, l'appareillage est encombrant et fragile. De nombreux auteurs ont donc recours à d'autres méthodes (Pore 1976).

**Le pouvoir moussant, évalué ici en terme de hauteur de mousse**, a été déterminé pour des *N*<sup>o</sup>-acylaminés issus d'hydrolysats totaux de protéine et de l'acide glutamique (Tableau I-9) (Xia and al. 1996). Celui-ci diminue lorsque la longueur de chaîne augmente du C12 au C18.



source d'acides aminés	longueur de la chaîne	hauteur de mousse (mm)
protéine de graines de coton (hydrolyse totale)	C12	165-170
	C14	115-119
	C16	40-45
	C18	15-21
protéine de soie (hydrolyse totale)	C12	152-155
	C14	31-32
	C16	26-28
	C18	19-21
acide glutamique	C12	189-192
	C14	182-185
	C16	180-185
	C18	155

**Tableau I-9 : Hauteur de mousse formée avec un appareil de Ross Miles pour une solution de concentration égale à 0,25% en tensioactifs (Xia and al. 1996)**

Un second paramètre important lorsqu'on étudie les propriétés moussantes concerne leur stabilité. **La stabilité moussante représente le volume de la mousse à un temps donné par rapport au volume de mousse formé au temps initial.** Les mousses sont des systèmes thermodynamiquement instables. Leur stabilité et leur destruction dépendent d'une série de phénomènes complexes qui commence par le drainage hydrodynamique du liquide, la dilution du film aqueux et la coalescence des bulles (Franses and al. 2004).

La présence d'additifs polaires ou l'utilisation de mélanges de tensioactifs qui permettent une diminution de la CMC peut conduire à une amélioration de la stabilité de la mousse. Les amides hydroxylés et les oxydes d'amines sont des additifs stabilisant les mousses (Larpernt 1993). La rupture des films peut être également réduite par l'augmentation des forces de répulsions entre les surfaces. Ainsi **les molécules amphiphiles possédant un caractère ionique avec des répulsions électrostatiques améliorent la stabilité des mousses** (Larpernt 1993; Axelos and al. 2006).

Des mesures de propriétés moussantes à l'aide de la méthode de Ross-Miles ont été réalisées sur des dérivés de  $N^{\epsilon}$ -acyllysines : le  $N^{\alpha},N^{\alpha},N^{\alpha}$ -triméthyl  $N^{\epsilon}$ -palmitoyllysine (TMPL), le  $N^{\alpha},N^{\alpha},N^{\alpha}$ -triméthyl  $N^{\epsilon}$ -lauroyllysine (TMLL), le  $N^{\alpha},N^{\alpha}$ -diméthyl  $N^{\epsilon}$ -palmitoyllysine (DMPL), le  $N^{\alpha},N^{\alpha}$ -diméthyl  $N^{\epsilon}$ -lauroyllysine (DMLL) (Tableau I-10) (Yokota and al. 1985). Les propriétés moussantes sont exprimées en hauteur de mousse. A partir de ces données, nous avons calculé la stabilité moussante (SM) à 10 et 30 min, d'après la formule suivante :

$$SM = \frac{\text{Volume de la mousse après un temps "t"}}{\text{Volume de mousse initial}} \times 100 \quad \text{Équation I-1}$$

ceci afin de comparer ces données à nos résultats expérimentaux.

			hauteur de mousse formée (mm)			stabilité moussante (%)	
	concentration (en %)	température (°C)	0 min	10 min	30 min	10 min	30 min
DMLL	0,025	40	180	174	174	97	97
	0,10	40	185	168	162	91	88
	0,25	40	210	197	194	94	92
DMPL	0,025	40	18	13	13	72	72
	0,10	40	165	82	38	50	23
	0,25	40	155	108	36	70	23
TMLL	0,025	60	156	7	0	4	0
	0,10	60	190	8	0	4	0
	0,25	60	195	8	0	4	0
TMPL	0,025	60	51	5	1	10	2
	0,10	60	159	15	5	9	3
	0,25	60	205	32	9	16	4

Tableau I-10 : Propriétés moussantes de dérivés de  $N^{\epsilon}$ -acyllysines (Yokota and al. 1985)

Bien que les mesures soient réalisées à des concentrations supérieures aux CMC des tensioactifs, elles ont une influence sur la capacité moussante : plus la solution est concentrée en tensioactifs, plus la hauteur de mousse formée est importante.

Sanchez-Vioque and al. ont caractérisé des mousses obtenues à partir d'hydrolysats partiels de protéines de colza acylés. **Les mousses formées à l'aide des hydrolysats acylés avec une chaîne en C10 et C12 ont une excellente texture et la taille des bulles obtenues est très homogène, avec un diamètre moyen des bulles de 200 µm. Ce système est très stable. Les bulles coalescent de façon marginale. Les mousses obtenues à partir des hydrolysats acylés avec une chaîne en C14 et C16 sont constituées de bulles de grande et petite taille, qui conduisent rapidement à la déstabilisation du système** (Sanchez-Vioque and al. 2001). Les peptides acylés avec des chaînes en C10 et C12 sont donc des dérivés tensioactifs dont le comportement se rapproche plus de celui des détergents que celui des protéines, connues pour leurs propriétés émulsifiantes. Ils présentent un bon pouvoir moussant, légèrement inférieur au dodécylsulfate de sodium (SDS). Leur capacité de rétention d'un liquide est intermédiaire entre celle d'un émulsifiant de type protéine et celle d'un détergent. En revanche, les bulles formées sont particulièrement stables. La faible coalescence des bulles au cours du vieillissement met en évidence la réelle capacité de ces dérivés à stabiliser durablement l'interface air-eau, contrairement à celle qui est observée pour le SDS (Larre and al. 2003).

#### **I.2.4.3. Les propriétés émulsifiantes**

**Les émulsions sont constituées d'un mélange de deux liquides non miscibles : une phase aqueuse et une phase lipidique.** Il existe deux types d'émulsions simples : les émulsions formées de gouttelettes d'eau contenues dans une phase dispersante d'huile (émulsion d'eau dans huile) et les émulsions formées de gouttelettes d'huile contenues dans une phase dispersante aqueuse (émulsion huile dans eau). **Les émulsions sont des systèmes thermodynamiques instables.** Leur déstabilisation est principalement due à la conséquence de quatre mécanismes : la sédimentation ou le crémage, la floculation, la coalescence et le mûrissement d'Ostwald. Le mûrissement d'Ostwald est le processus qui conduit au grossissement des grosses gouttelettes au détriment des plus petites, par transport de matière à travers la phase continue. Ce phénomène est souvent négligeable dans les émulsions car les matières grasses présentes sont peu solubles dans l'eau (Axelos and al. 2006).

La préparation et la stabilisation d'émulsions, dispersion d'un liquide (eau ou huile) dans un liquide non miscible (huile ou eau), requiert la présence d'un ou plusieurs composés tensioactifs, dont le rôle est de diminuer la tension interfaciale eau/huile, afin de permettre la dispersion (augmentation de l'aire interfaciale). Les propriétés émulsifiantes peuvent être décrites par trois facteurs : la taille des gouttelettes d'huile et leur évolution dans le temps, la cinétique de floculation-crémage et enfin la résistance à la coalescence (Larre and al. 2006).

Les émulsions obtenues à partir de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique partielle de protéines de colza, après fonctionnalisation par des chlorures d'acides gras ayant des longueurs de chaîne de 10 à 14 carbones, ont été comparées à celles obtenues avec du SDS (Larre and al. 2003). Les émulsions stabilisées avec le SDS sont fines, avec des gouttes comprises entre 2,54 et 13,85  $\mu\text{m}$ , même après stockage, et sont peu sujettes à la floculation et au crémage, mais résistent très mal à la coalescence (Sanchez-Vioque and al. 2004). Ce comportement est assez caractéristique de celui des émulsions stabilisées par des tensioactifs de faible taille qui ne confèrent, en général, pas de résistance mécanique au film interfacial.

**Pour les émulsions stabilisées avec les peptides de colza acylés, plus la chaîne est longue, meilleures sont les propriétés émulsifiantes. En particulier, les résultats les plus remarquables sont obtenus avec des peptides greffés en C14 : taille de gouttelettes plus faible et stable, meilleure résistance à la floculation-crémage et surtout à la coalescence.** Ainsi, ces peptides ont un comportement intermédiaire entre celui des tensioactifs de synthèse (faible taille de goutte) et celui des protéines (résistance à la coalescence).

La capacité émulsionnante d'hydrolysats totaux de protéine de coton et de soie acylés et de  $N^{\alpha}$ -acylglutamates de sodium avec des chaînes de C12 à C18 a été également mesurée (Xia and al. 1996). Contrairement aux résultats décrits par Sanchez-Vioque and al. avec les hydrolysats de colza acylés, **celle-ci ne semble pas dépendre de la longueur de la chaîne hydrophobe, ni de la nature des protéines de départ.**

#### **I.2.4.4. Les propriétés antimicrobiennes**

Le potentiel d'utilisation des tensioactifs comme agents antimicrobiens est particulièrement intéressant. **Certains tensioactifs à base d'acides aminés possèdent une activité antimicrobienne :**

- les dérivés acylaminimides, dont l'activité antimicrobienne dépend de la longueur de la chaîne lipophile ; l'activité maximale est obtenue avec des chaînes de C14 et C16 (Kabara and Haitzma 1975; Kabara and al. 1975)
- les acides  $\alpha$ -aminé- $\beta$ -alkoxypropioniques, dont l'activité antimicrobienne est corrélée à leur CMC (Xia and al. 1995).

Quelques études de propriétés antimicrobiennes de tensioactifs  $N^{\alpha}$ -acylaminés, les  $N^{\alpha}$ -acylarginines et les  $N^{\alpha}$ -lauroyllysines, ont été menées (Nakamiya and al. 1976; Infante and al. 1984; Molinero and al. 1988). Pour cela, leur concentration minimale inhibitrice (CMI) a été mesurée sur plusieurs bactéries. **La CMI correspond à la plus petite concentration, pour un tensioactif donné, qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne, après 18 heures de culture, à 37°C** (Archambaud 2000). **Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.** Ces composés donnent toujours des CMI supérieures à 200  $\mu\text{g/mL}$  et par conséquent ils peuvent être considérés comme inactifs.

Les CMI ont été également évaluées sur des tensioactifs qui possèdent un caractère cationique, à base de lysine et d'arginine. Le DL-lysine ester de lauryle, le DL-lysine amide de lauryle et le DL-arginine ester de lauryle possèdent une bonne activité antimicrobienne contrairement aux autres acides aminés d'ester de lauryle non cationiques (Nakamiya and al. 1976). Par ailleurs, les CMI des  $N^{\alpha}$ -acylarginines esters de méthyle avec une chaîne alkyle de 8 à 14 atomes de carbones, des  $N^{\alpha}$ -lauroylarginines esters de propyle et d'éthyle ont été déterminées (Infante and al. 1984). **Les composés ayant la CMI la plus faible sont les  $N^{\alpha}$ -lauroylarginines esters de propyle et d'éthyle. Pour les  $N^{\alpha}$ -acylarginine ester de méthyle, la meilleure activité est observée pour les composés ayant une chaîne en C12.**

Les propriétés antimicrobiennes d'autres tensioactifs cationiques à base d'arginine de structures différentes et plus complexes (Figure I-17) ont été également déterminées. Ainsi, la CMI de tensioactifs possédant deux acides aminés comme tête polaire, obtenus par condensation du  $N^{\alpha}$ -lauroylarginine et d'un acide aminé issu d'un hydrolysat de collagène ou d'acides aminés purs a été mesurée sur plusieurs bactéries (Infante and al. 1984; Molinero and al. 1988). **Bien qu'ils possèdent des CMI plus élevées que les  $N^{\alpha}$ -lauroylarginines esters d'éthyle et de propyle, ils peuvent être également considérés comme des substances préservatrices et protectrices. De même, des géminis tensioactifs à base d'arginine possèdent une activité antimicrobienne.** Leur CMI n'évolue pas de façon linéaire avec la chaîne alkyle et la chaîne espaceur. L'activité optimale est obtenue avec des chaînes acylées de 10 et 12 carbones. Cet optimum peut être attribué à la combinaison de plusieurs paramètres

physico-chimiques : le caractère hydrophobe, l'adsorption, la CMC, la solubilité dans l'eau, etc. (Perez and al. 2002).

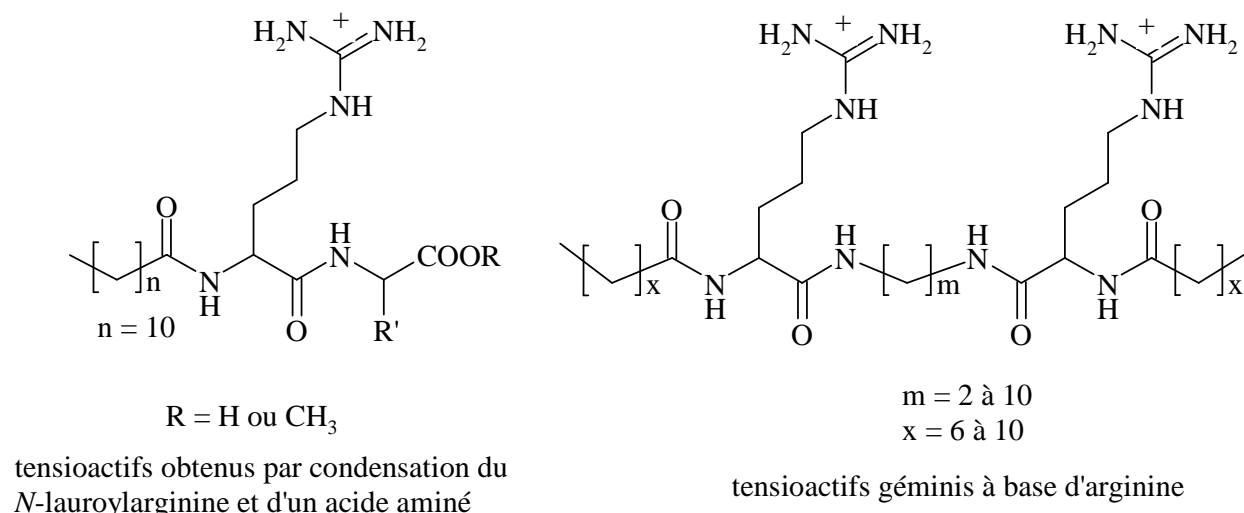


Figure I-17 : Formule développée de tensioactifs à base d'arginine

Les propriétés antimicrobiennes de certains tensioactifs amphotères à base d'acides aminés acylés a été montrées. De nombreux tensioactifs à base d'hydrolysats de protéines (caséine, kératine, collagène) et d'acides gras se sont révélés non irritants et non sensibilisants (Sokol 1974; Narasimhan and al. 1980). Ainsi, des hydrolysats totaux de blé acylés avec des chaînes de C12 à C16 sont utilisés dans des formulations de produits cosmétiques telles que des formulations pour shampoings et pour des crèmes non irritantes (Berger and Gacon 1992).

### 1.2.5. Conclusion

La présence de nombreux sites fonctionnels sur les acides aminés permet d'envisager un grand nombre de voies de synthèse de tensioactifs. Toutefois, **la réaction de Schotten-Baumann, simple de mise en œuvre, respectueuse des 12 principes de la chimie verte et offrant le meilleur rapport coût/rendement, demeure la voie privilégiée pour l'obtention de tensioactifs *N*<sup>a</sup>-acylés.** Cependant, les rendements des *N*-acylations sont rarement explicités et les compositions des mélanges finaux ne sont pas étudiées.

**Ces tensioactifs possèdent une activité de surface élevée avec des CMC parfois inférieures à 0,5 g/L et des tensions de surface souvent inférieures à 40 mN/m. Leurs**

**propriétés tensioactives varient en fonction de la nature de la tête hydrophile, c'est-à-dire de l'acide aminé utilisé et de la longueur de la chaîne hydrophobe. Celle-ci peut donc être modulée en fonction des propriétés souhaitées.** Les chaînes en C12-C14 sont privilégiées pour obtenir des agents moussants et celles en C16-C18 pour des agents émulsionnants.

**Par ailleurs, dans le cas des hydrolysats acylés, on est en présence de mélange. Il est donc intéressant de comprendre le comportement des mélanges de tensioactifs par rapport aux tensioactifs purs. Cette meilleure compréhension permettrait d'optimiser leur formulation.**

### **I.3. Les mélanges de tensioactifs**

**La plupart des tensioactifs utilisés dans les applications sont des mélanges. Il est donc essentiel d'évaluer et de comprendre les interactions existantes entre les différentes entités du mélange (Al Sabagh 2002).**

**Quand une solution d'un mélange de tensioactifs montre de meilleures propriétés de surface (tension de surface plus faible) que celles obtenues avec ses constituants pris individuellement, il y a un phénomène de synergie. Les mélanges de deux tensioactifs peuvent exhiber une synergie si les deux tensioactifs s'attirent suffisamment, grâce, en particulier, aux attractions électrostatiques naturelles des groupes hydrophiles de charges opposées ou grâce aux interactions de Van der Waals de leur groupe hydrophobe.**

#### **1.3.1. La synergie des mélanges de tensioactifs**

Tous les travaux réalisés à ce jour dans ce domaine, et brièvement décrits ci-après, ne sont appliqués qu'aux mélanges de produits purs. Ces études ont été uniquement réalisées sur des mélanges binaires voir tertiaires.

##### **1.3.1.1. Le paramètre d'interaction $\beta$**

**L'interaction entre les tensioactifs peut être mesurée par un paramètre  $\beta$  qui correspond au coefficient d'activité dans le mélange. Plus ce paramètre est négatif, plus l'interaction**

**entre les deux tensioactifs est importante comparée à l'état de référence qui est l'interaction entre deux tensioactifs identiques** (Rosen 1991). L'évaluation des paramètres d'interaction pour la formation de micelles mixtes ( $\beta^M$ ) est basée sur des équations dérivées de la thermodynamique des systèmes (Rubingh 1979). On appelle micelle mixte une micelle qui est constituée d'au moins deux tensioactifs différents.

Pour un mélange de deux tensioactifs, le ratio de ces derniers, pour lequel la synergie est maximale, et les propriétés du mélange au point optimal de la synergie sont déterminés grâce aux équations qui découlent de la théorie des solutions régulières. Le paramètre d'interaction moléculaire  $\beta^\sigma$  pour la formation de monocouche à l'interface eau/air est calculé de la même façon (Rosen and Hua 1982).

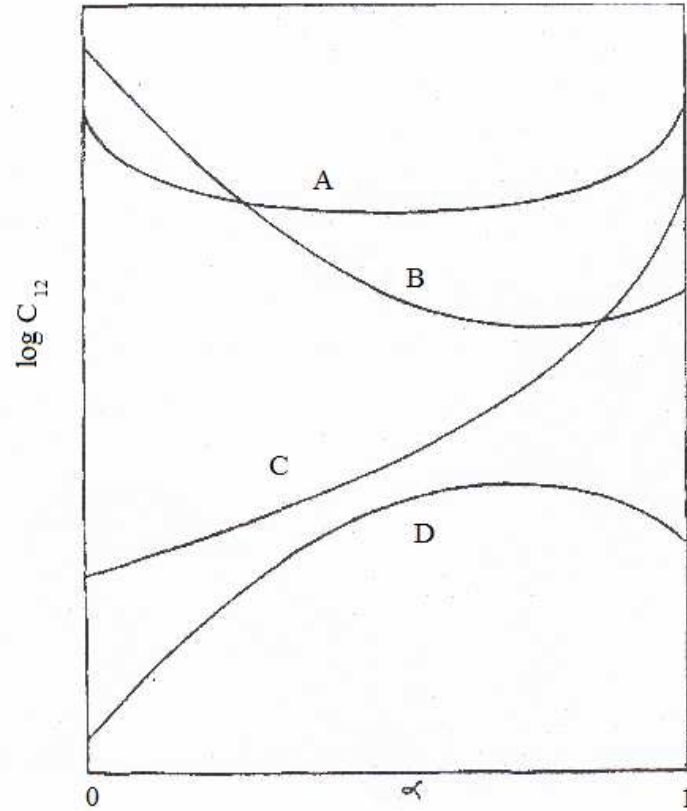
### 1.3.1.2. Synergie dans la formation des micelles mixtes

**La synergie dans la formation de micelles mixtes a lieu lorsque la CMC du mélange est inférieure à la CMC des tensioactifs individuels.** Pour un mélange contenant deux tensioactifs, la synergie s'exerce lorsque :

- (1) les deux tensioactifs s'attirent dans la micelle mixte, soit  $\beta^M < 0$
- (2) cette attraction doit être plus grande que la différence entre les logarithmes de leur valeur de CMC, soit  $|\beta^M| > |\ln(C_1^M/C_2^M)|$  où  $C_1^M$  et  $C_2^M$  représentent les CMC des tensioactifs 1 et 2, respectivement.

**La valeur de  $\beta^M$  mesure l'étendue de la déviation du mélange du comportement idéal.** Quand  $\beta^M$  est plus grand que la différence des logarithmes des CMC des deux composés purs, il y a synergie (Figure I-18, cas B). Une synergie négative peut exister quand  $\beta^M > 0$  et que  $|\beta^M| > |\ln(C_1^M/C_2^M)|$  (Figure I-18, cas D). Une interaction répulsive entre deux tensioactifs peut nuire aux propriétés du mélange par rapport aux tensioactifs seuls.





(A) : synergie quand  $\beta^\sigma < 0$ ,  $|\ln C_1^0/C_2^0| \approx 0$  ; (B) : synergie quand  $\beta^\sigma < 0$  et  $|\beta^\sigma| > |\ln C_1^0/C_2^0|$  ;  
 (C) : pas de synergie quand  $\beta^\sigma > 0$  et  $|\beta^\sigma| < |\ln C_1^0/C_2^0|$  ; (D) synergie négative quand  $\beta^\sigma > 0$  et  $|\beta^\sigma| > |\ln C_1^0/C_2^0|$

Figure I-18 : CMC d'un mélange binaire de tensioactifs ( $C_{12}$ ) en fonction de  $\alpha$  (fraction molaire du tensioactif 1 du système total) (Rosen 1991)

### 1.3.1.3. Synergie de l'efficacité de la réduction de la tension de surface

Une synergie de l'efficacité de la réduction de la tension de surface existe lorsqu'une tension de surface donnée est obtenue avec une concentration en tensioactif totale inférieure à celle requise avec un seul tensioactif présent dans le mélange (Figure I-19, cas A). Les conditions requises sont :

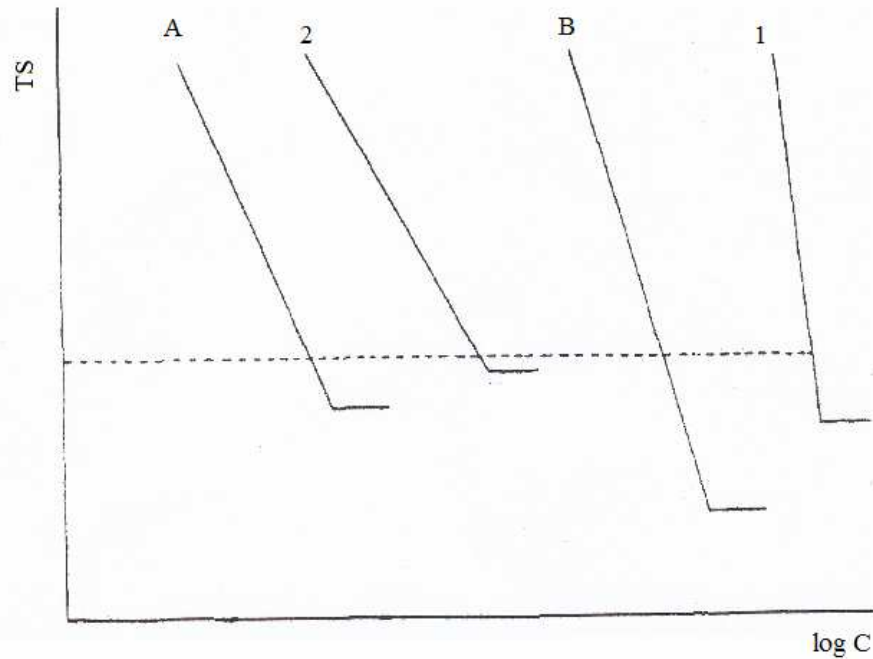
- (1)  $\beta^\sigma < 0$
- (2)  $|\beta^\sigma| > |\ln (C_1^0/C_2^0)|$ , avec  $C_1^0$ ,  $C_2^0$  la concentration molaire du tensioactif 1 et 2, respectivement, dans la solution, requise pour obtenir la même tension de surface désirée.

La fraction molaire de tensioactifs et la valeur minimale de la CMC au point de la synergie optimale peuvent être également évaluées grâce aux équations dérivées de la théorie des solutions régulières.

**Un autre type de synergie existe lorsque le mélange de tensioactifs atteint la même CMC, avec une tension de surface plus faible que celle obtenue au CMC des tensioactifs individuels** (Figure I-19, cas B). Les conditions requises sont :

- (1) l'attraction entre les deux tensioactifs doit être plus grande dans la monocouche mixte à la surface que dans les micelles mixtes dans la solution, soit  $\beta^{\sigma} - \beta^M < 0$
- (2)  $|\beta^{\sigma} - \beta^M| > |\ln [(C_1^{0,CMC} C_2^M)/(C_2^{0,CMC} C_1^M)]|$ , avec  $C_1^{0,CMC}$  et  $C_2^{0,CMC}$  sont la CMC molaire des tensioactifs 1 et 2 purs, respectivement requises pour donner une valeur de tension de surface égale à n'importe quel mélange des deux tensioactifs à cette CMC.

**La valeur du paramètre  $\beta$  est cruciale pour déterminer si un mélange présente une synergie.** Les interactions moléculaires entre les tensioactifs et, par conséquent, la valeur des paramètres  $\beta$  sont généralement dominées par les forces électrostatiques qui peuvent exister entre leurs groupes hydrophiles. **La valeur du paramètre  $\beta$  est généralement plus négative dans les mélanges de tensioactifs anioniques/cationiques.**



(1) tensioactif 1 pur, (2) tensioactif 2 pur, (A) mélange des tensioactifs 1 et 2 avec une synergie de type réduction de la CMC ( $C_{12} < C_1^0$  ou  $C_2^0$ , avec  $C_{12}$  la CMC du mélange), (B) mélange des tensioactifs 1 et 2 avec une synergie de type réduction de la tension de surface à la CMC ( $TS_{12}^{CMC} < TS_1^{CMC}$  ou  $TS_2^{CMC}$ , avec  $TS_{12}^{CMC}$ ,  $TS_1^{CMC}$ ,  $TS_2^{CMC}$  les tensions de surface à la CMC du mélange des tensioactifs 1 et 2, du tensioactif 1 seul et du tensioactif 2 seul, respectivement)

Figure I-19 : Efficacités de la synergie de la réduction de tension de surface à une fraction molaire  $\alpha$  donnée (Rosen 1991)

### I.3.2. Les mélanges de tensioactifs anioniques et cationiques

Il existe de nombreux exemples de mélanges de tensioactifs dans le marché des produits ménagers. Comme l'idée bien établie que les tensioactifs anioniques et cationiques ne peuvent pas être présents dans la même formulation, les mélanges sont faits généralement entre des tensioactifs de même nature ou sans opposition de charges (mélanges de tensioactifs anioniques/anioniques, cationiques/cationiques, non ioniques/non ioniques, amphotères/amphotères, anioniques/non ioniques, cationiques/non ioniques ou amphotères/non ioniques). **Cependant la synergie augmente en présence de tensioactifs de charges différentes** (Rosen and Hua 1982; Mehreteab and Loprest 1988). **En effet, une forte synergie est observée avec un mélange de tensioactifs anioniques/cationiques. Une meilleure compréhension de ces systèmes pourrait donc élargir l'horizon des formulations.**

### I.3.2.1. La formation des complexes anioniques/cationiques

Quand de petites quantités de tensioactifs anioniques ou cationiques sont ajoutées en solution aqueuse, il existe seulement des monomères dans la solution. Quand la concentration augmente et atteint la CMC, des micelles commencent à se former. **Si, la concentration des deux monomères, anionique et cationique, atteint la limite de solubilité du produit, on observe une précipitation et le mélange de tensioactifs devient alors inefficace.** Stellner and al. ont étudié des mélanges binaires de tensioactifs anionique/cationique, sur une large gamme de concentration, pour développer un modèle qui fournirait une limite de phase complète pour ce système (Stellner and al. 1988).

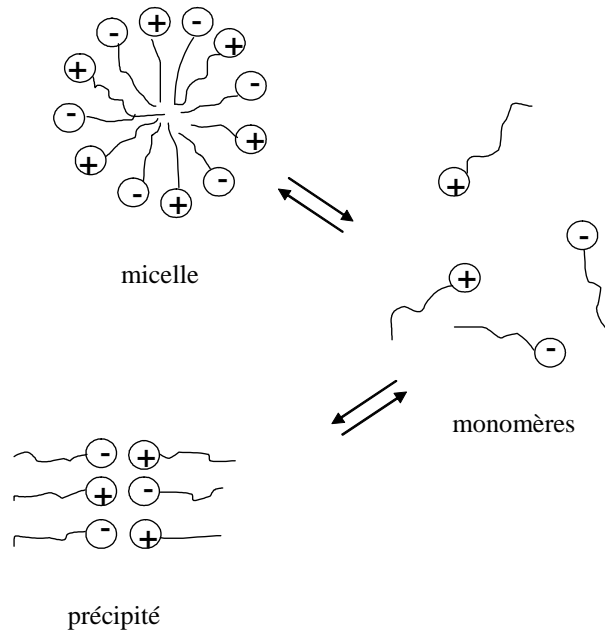
Selon la Figure I-20, les tensioactifs peuvent être présents sous trois formes différentes : comme monomères, incorporés dans des micelles mixtes et précipités. La formation du précipité peut être représenté par  $DS^-(aq) + DP^+(aq) \leftrightarrow DSDP(s)$ , où  $DS^-$  correspond à l'anion du dodécyl sulfate et  $DP^+$  est le cation dodécylpyridinium et DSDP est le précipité. La réaction peut être décrite par le produit de solubilité :

$$K_{sp} = [DS^-]_{mon} [DP^+]_{mon} f_{\pm}^2 \quad \text{Équation I-2}$$

$K_{sp}$  : produit de solubilité

$[DS^-]_{mon}$  et  $[DP^+]_{mon}$  : concentrations respectives des monomères

$f_{\pm}$  : coefficient d'activité



**Figure I-20 : Schéma de l'équilibre basique d'un système de tensioactifs anioniques/cationiques**

L'idée étant de calculer la frontière de la phase précipitée. Pour cela, on considère que tous les tensioactifs de la frontière sont présents sous forme de monomères ou de micelles mixtes, d'où :

$$C_{NaDS} = [DS^-]_{mon} + [DS^-]_{mic} \quad \text{Équation I-3}$$

$$C_{DPCl} = [DP^+]_{mon} + [DP^+]_{mic} \quad \text{Équation I-4}$$

$C_{NaDS}$  et  $C_{DPCl}$  sont la concentration totale de NaDS et DPCl dans la solution, respectivement.

$[DS^-]_{mic}$  et  $[DP^+]_{mic}$  : la concentration de chaque tensioactifs, de DS et DP, respectivement, dans les micelles mixtes.

Pour calculer la concentration des monomères, il est nécessaire de modéliser l'équilibre monomère-micelle. En appliquant la théorie des solutions régulières et en considérant que les micelles sont une pseudo-phase de tensioactifs, nous obtenons un diagramme de phase théorique (Figure I-21). Ainsi, le modèle développé par Stellner peut prédire la frontière de la phase de précipitation. Ce modèle théorique a été comparé à l'expérience (Figure I-21). La déviation expérimentale observée sur la branche riche en NaDS est probablement due à la présence de coacervats.

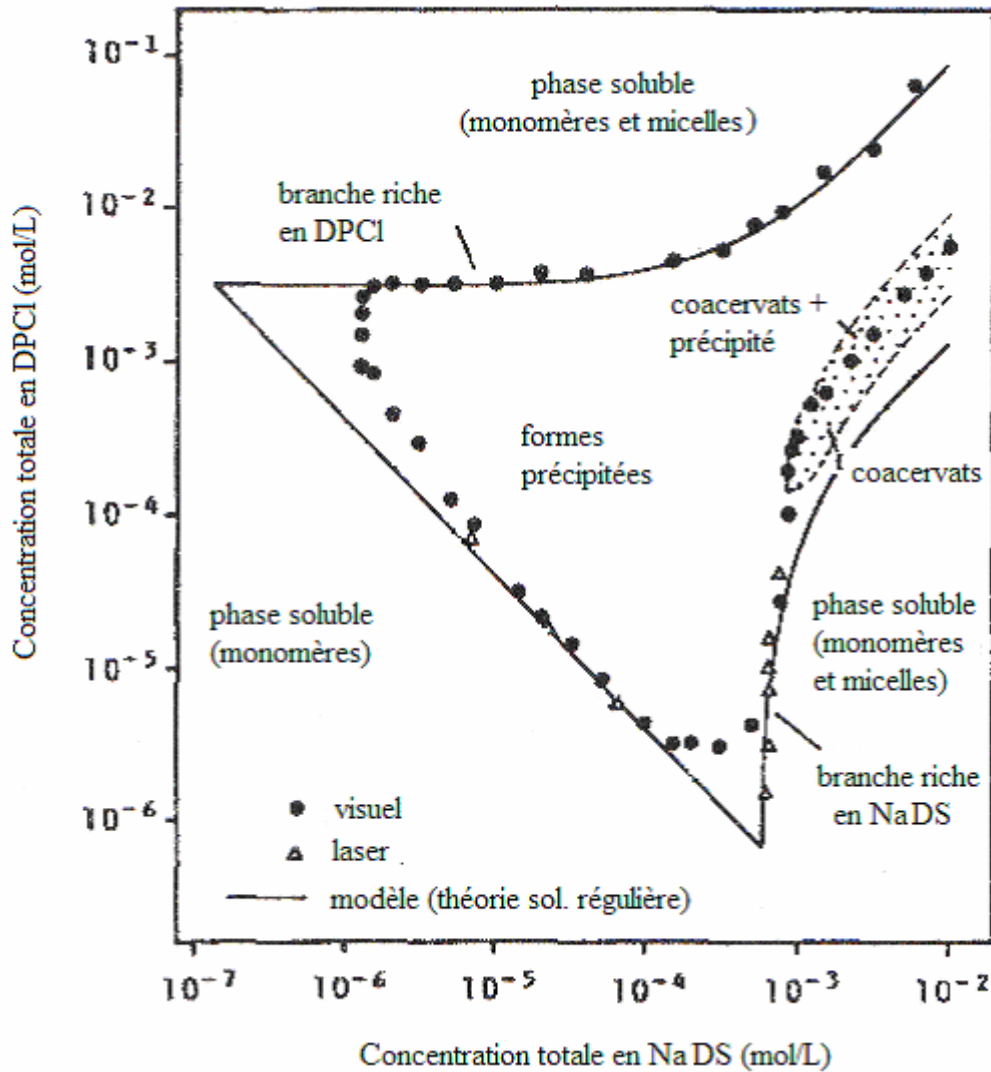


Figure I-21 : Frontière de la phase précipitée prédite en utilisant la théorie des solutions régulières (Stellner and al. 1988)

L'influence sur le modèle de Stellner de quelques variables telles que le pH, la température, la longueur de la chaîne hydrophobe a été étudiée (Amante and al. 1991). Pour le couple DS/DP, le pH a une faible influence et les électrolytes ajoutés pour ajuster le pH sont négligeables. L'augmentation de la température réduit les frontières de la phase précipitée. Pour un système étudié, plus la température est élevée, plus la concentration du tensioactif doit être élevée, pour obtenir une phase précipitée.

### I.3.2.2. La synergie des mélanges de tensioactifs anioniques/cationiques

#### I.3.2.2.1. La tension de surface

Lucassen and al. ont étudié la tension de surface de plusieurs mélanges de SDS/DTAB (Lucassen-Reynders and al. 1981). D'après le Figure 1-22, il est évident **qu'il existe une forte synergie dans le mélange anionique/cationique**. Par exemple, pour atteindre la tension de surface de 50 mN/m, une concentration de 4,5 mmol/L de SDS seul est nécessaire contre  $9 \cdot 10^{-3}$  mmol/L du mélange équimolaire.

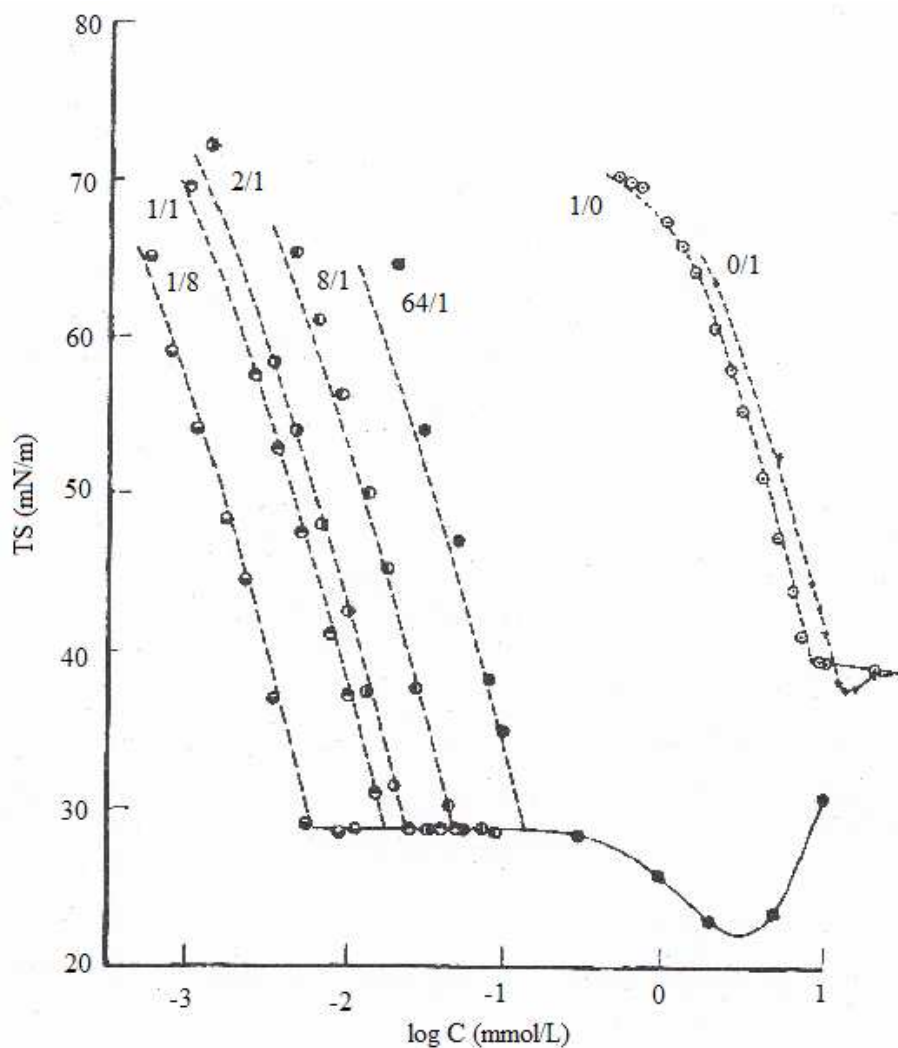
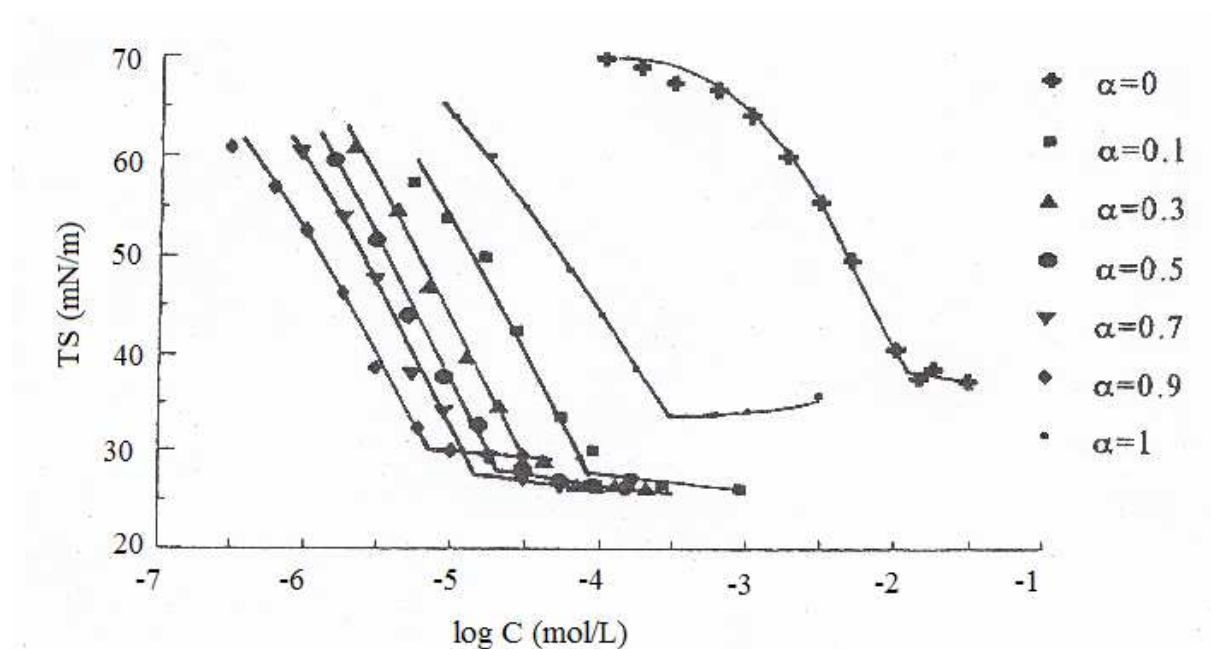


Figure 1-22 : Tension de surface de mélanges de SDS/DTAB à différents ratios

(Lucassen-Reynders and al. 1981)

Selon Lucassen-Reynders et en considérant que R est le tensioactif avec la charge formelle respective, seule les combinaisons électroneutres d'ions peuvent avoir lieu. Ainsi, dans un système  $\text{Na}^+\text{R}^-/\text{Br}^-\text{R}^+$ , il y a quatre combinaisons possibles. La combinaison  $\text{Na}^+\text{Br}^-$  n'a pas d'activité de surface et il est montré que la combinaison  **$\text{R}^+\text{R}^-$  a une meilleure activité de surface que  $\text{Na}^+\text{R}^-$  ou  $\text{R}^+\text{Br}^-$**  (Lucassen-Reynders 1972). Ainsi l'adsorption de  $\text{R}^+\text{R}^-$  sera plus grande que celle de  $\text{Na}^+\text{R}^-$  ou  $\text{R}^+\text{Br}^-$ , à la même concentration. Cette plus grande adsorption conduit à une plus faible tension de surface. Des résultats similaires aux travaux de Lucassen-Reynders sur la tension de surface sont obtenus par Cui et Canselier avec un mélange de sulfate de triéthanolammonium dodécylpoly(oxyéthylène) (TADPS)/bromure de dodécyltriméthylammonium (DTAB) (Cui and Canselier 2001).



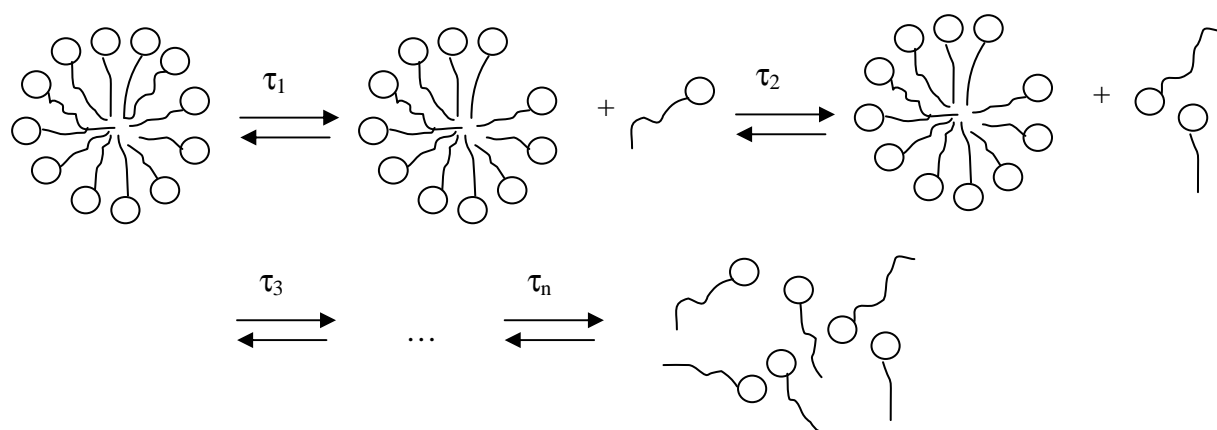
$\alpha$  : fraction molaire de TADPS

Figure I-23 : Tension de surface du mélange TADPS/DTAB à 25°C (Cui and Canselier 2001)

#### I.3.2.2.2. Stabilité des micelles

Une synergie est également observée dans la stabilisation des micelles. Le temps de relaxation des micelles a été étudié (Patist and al. 2001). Les micelles sont toujours en équilibre dynamique avec des monomères en solution, continuellement désintégrées et reformées (Figure I-24).





**Figure I-24 : Mécanisme des temps de relaxation pour un tensioactif dont la concentration est supérieure à sa CMC (Patist and al. 2001)**

La stabilité micellaire serait directement corrélée aux répulsions coulombiennes. La minimisation des répulsions de charge entre les micelles améliorerait considérablement la stabilisation des structures micellaires. L'addition de tensioactifs de charges opposées diminue la densité de surface de charge de la micelle mixte (Filipovic-Vincekovic and al. 1995), améliorant ainsi la stabilité des micelles et donc la détergence (Patist and al. 1997). Patist and al. ont mesuré le temps de relaxation de micelles de SDS en présence d'une longue chaîne alcool (dodécanol) ou d'un tensioactif cationique (bromure de dodécyltriméthylammonium,  $C_{12}TAB$ ) (Patist and al. 2002) et ont trouvé les valeurs suivantes :

SDS (25 mM),  $\tau_2 = 1$  ms

SDS (25 mM) +  $C_{12}OH$  (1,25 mM),  $\tau_2 = 230$  ms

SDS (25 mM) +  $C_{12}TAB$  (10 mM),  $\tau_2 = 2000$  ms

**Les tensioactifs cationiques**, quand ils sont utilisés dans des concentrations qui évitent leur précipitation et qui favorisent la formation de micelles mixtes avec des tensioactifs anioniques, **peuvent améliorer les propriétés de détergence des tensioactifs anioniques**. En effet, les micelles mixtes anioniques/cationiques présentent des temps de relaxation plus long, ce qui signifie qu'elles sont plus stables. **Une solution micellaire plus stable conduit à une détergence plus efficace** (James-Smith and al. 2007). Les solutions micellaires stables ont une concentration élevée en micelles disponibles pour solubiliser des salissures grasses.

Les micelles ont une structure compacte qui permettrait de minimiser la redéposition des salissures.

### **I.3.3. Conclusion**

**Les mélanges de tensioactifs peuvent présenter une synergie. Celle-ci est quantifiable par l'évaluation du paramètre d'interaction  $\beta$ . Plus celui-ci est négatif, plus la synergie du mélange sera importante.** Il faut donc que les interactions entre les tensioactifs soient suffisamment fortes. C'est pour cette raison que les plus grandes synergies sont observées pour les mélanges de tensioactifs de charges opposées. L'utilisation de telles formulations est donc particulièrement intéressante. Toutefois, les molécules tensioactives doivent être solubles. En effet, la présence simultanée de molécules cationiques et anioniques favorise leur précipitation.

**Cependant, l'étude de telles synergies et les limites de solubilité des mélanges de tensioactifs ont été modélisées et étudiées sur des mélanges de tensioactifs binaires. Or, nos formulations sont constituées de très nombreuses molécules amphiphiles. Au stade actuel de l'avancement de nos travaux, nous n'avons pas abordé cette problématique (calcul du paramètre d'interaction, du point de synergie optimum). Nous nous sommes essentiellement intéressés donc à leurs propriétés tensioactives qualitatives que nous avons comparées à celles des tensioactifs commerciaux présents seuls en solution.**

## **I.4. Conclusion générale**

Dans un contexte de développement durable, combiné à un prix du baril de pétrole croissant, les ressources végétales renouvelables issues de l'agriculture sont une alternative intéressante aux ressources pétrochimiques. La plupart des tensioactifs obtenus à partir de ces nouvelles matières premières connaissent un fort développement, en particulier ceux dérivés de sucres ou d'acides aminés. **L'une des voies les plus intéressantes pour obtenir des tensioactifs à base d'acides aminés est de greffer la chaîne hydrophobe, selon une *N*-acylation de Schotten-Baumann. En raison de leur coût avantageux et de leur activité de surface élevée, les peptides *N*<sup>a</sup>-acylés sont particulièrement intéressants.** Toutefois, ces derniers ont été peu étudiés (Sanchez-Vioque and al. 2001; Sanchez-Vioque and al. 2004). **Notre premier objectif a été de sélectionner, selon certains critères de choix, notre substrat**

**protéique et d'étudier les conditions optimales d'hydrolyse en vue d'obtenir un mélange peptidique propice à l'obtention de tensioactifs.** Toute cette étude fait l'objet du chapitre III. Puis, dans le chapitre suivant, **nous avons étudié la réaction de *N*-acylation** : dans un premier temps sur des substrats modèles, des acides aminés, pour lesquels nous avons déterminé la teneur de tous les composants du mélange final et, dans un second temps, sur l'hydrolysate peptidique précédemment obtenu. **Les propriétés tensioactives de tous ces mélanges ont été évaluées.**

Enfin, en vue d'accroître le champ d'application de ces molécules et aux regards des propriétés spécifiques accordées aux tensioactifs cationiques, **nous avons développé une nouvelle gamme de mélanges, par réactivité du chlorure de glycidyltriméthylammonium sur les formulations anioniques, avec l'objectif d'obtenir des tensioactifs cationiques à base de protéines.**

**Ainsi, étudier et obtenir selon des procédés intégrant la chimie verte, deux grandes familles de tensioactifs anioniques et cationiques à base de peptides de pois modifiés constitue une démarche originale et intéressante. C'est cette démarche et les résultats auxquels elle nous a conduits que nous nous proposons d'exposer dans la suite de ce mémoire.**

## BIBLIOGRAPHIE

ADEME (2001) Tensioactifs et oléagineux : Etude sur les matières premières oléagineuses disponibles sur le marché européen.

Al Sabagh A. (2002) The relevance HLB of surfactants on the stability of asphalt emulsion. *Journal of Colloid Interfaces A* 204:73.

Alcimed (2007) Etude du marché actuel des bioproduits industriels et des biocarburants & évolutions prévisibles à 2015/2030.

Amante J.C., Scamehorn J.F. and Harwell J.H. (1991) Precipitation of mixtures of anionic and cationic surfactants: III. Effect of surfactant structure, temperature and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*. 167:332.

Antoine J.P., Marcilloux J., Lefeuvre M., Plusquellec D., Benvegny T., Goursaud F. and Parant B. (2004) Compositions tensioactives à base d'esters ou d'amides de la glycine bêtaïne, obtenus en faisant réagir la glycine bêtaïne avec un acide sulfonique et un alcool ou une amine à chaîne grasse dérivé d'huile végétales. Patent N°FR2869913.

Archambaud M. (2000) Méthodes d'évaluation de l'activité antibiotique. *Brûlures*. 1:141.

Axelos M., Bérot S., Schmidt I. and Guéguen J. (2006) Propriétés tensioactives et détergentes de biopolymères amphiphiles. In *La chimie verte*. P. Colonna, Ed. Lavoisier: Paris, p 271.

Barett G.C. (1999) Reactions at the carboxy group of an amino acids and peptides with alcohols conducted in the presence of monoalkyl sulfates prepared from chlorosulfonic acid and the alcohol. In *Amino acid derivatives*. p 37.

Berger C. and Gacon P. (1992) Preparation of N-acyl derivatives of amino acid mixtures obtained from cereal protein hydrolyzates for cosmetics. Patent N° FR9221318.

Bognolo G. (2008). Surfactants market trends in Europe. CESIO, Paris.

Boissonpaas R.A. (1951) Une nouvelle méthode de synthèse peptidique. *Helvetica Chimica Acta*. 34:874.

Bondi S. (1909) II. Lipopeptide, ihre bedeutung, synthese und eigenschaften (laurylglycin und laurylalanin). *Zeischrift für Biochemie*. 17:543.

Bonnevie C. (1998) Synthèse et étude physico-chimique de nouveaux tensioactifs glucidiques. Chambéry, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Chambéry, Université de Savoie. thèse de doctorat.

Cartwright N.J. (1955) Serratamic acid, a derivative of L-serine produced by organisms of the Serratia group. *The Biochemical Journal*. 60(2):238.

Cartwright N.J. (1957) The structure of serratamic acid. *The Biochemical Journal*. 67(4):663.

Clapes P., Moran C. and Infante M.R. (1999) Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*. 63(3):333.

Cui Z.G. and Canselier J.P. (2001) Interfacial and aggregation properties of some anionic/cationic surfactant binary systems II. Mixed micelle formation and surface tension reduction effectiveness. *Journal of Colloid and Polymer Science*. 279:259.

Desai A. and Bahadur P. (1992) Surface activity and micellar behavior of sodium salts of N-acyl glycine, glycylglycine, and diglycylglycine. *Tenside, Surfactants, Detergents*. 29(6):425.

Desai A. and Bahadur P. (1993) Synthesis and surfactant properties of sodium salts of N-acylsarcosines. *Tenside, Surfactants, Detergents*. 30(5):315.

Filipovic-Vincekovic N., Bujan M., Dragcevic D. and Nekić N. (1995) Phase behavior in mixtures of cationic and anionic surfactants in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Polymer Science*. 273:182.

Franses E.I., Prosser A.J., Infante M.R., Perez L. and A. P. (2004) Adsorption and surface tension behavior of gemini surfactants at air-water, oil-water, and solid-water interfaces. *Surfactant Science Series*. 117(Gemini Surfactants):65.

Gallot B. and Douy A. (1986) Lipopeptides, leur obtention et leur applications comme émulsifiants. Patent N° US4600526.

Geiger R. and Köning W. (1981) Amine protecting groups. In *The peptides*. E. Gross and J. Meienhofer, Eds. Academic Press: London, Vol. 3.

George A., Modi J., Jain N. and Bahadur P. (1998) A comparative study on the surface activity and micellar behavior of some N-acylamino acid based surfactants. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical & Analytical Chemistry*. 37A(11):985.

Godtfredsen S.E. and Bjoerkling F. (1990) An enzyme-catalyzed process for preparing N-acyl amino acids and N-acyl amino acid amides. Patent N° DK9014429.

Gryc W., Dabrowska M., Tomicka B., Perkowska D. and Kupryszewski G. (1979) Antibacterial peptide derivatives. Part V. Hydrochlorides of 2-aminoethyl esters of N- $\alpha$ -palmitoyl-L-lysine and its peptides. *Polish Journal Of Chemistry*. 53(5):1085.

Heitmann P. (1968) A model for sulfhydryl groups in proteins. Hydrophobic interactions of the cysteine side chain in micelles. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 3(3):346.

Hentrich W., Keppler H. and Hintzmann K. (1930) Manufacture of washing agents and detergents. Patent N° DE546942.

Hidaka H., Murata M. and Onai T. (1984) Helical aggregates of chiral N-(2-hydroxydodecyl) amino acids. *Journal of the Chemical Society*. 562.

Holmberg K. (2001) Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 6(2):148-159.

Infante M.R., Garcia D., J., Erra P., Julia M.R. and Prats M. (1984) Surface active molecules: preparation and properties of long chain N $\alpha$ -acyl-L- $\alpha$ -amino- $\omega$ -guanidine alkyl acid derivatives. *International Journal of Cosmetic Science*. 6:275.

Infante M.R., Molinero J. and Erra P. (1992) Lipopeptidic surfactants. II. Acidic and basic Na-lauroyl-L-arginine dipeptides from pure amino acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69(7):647.

Infante M.R., Perez L., Pinazo A., Clapes P., Moran M.C., Angelet M., Garcia M.T. and Vinardell M.P. (2004) Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chimie*. 7(6-7):583.

Infante M.R., Pinazo A. and Seguer J. (1997) Non-conventional Surfactants from Amino Acids and Glycolipids: Structure, Preparation and Properties. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 123-124:49.

Iyer V.N., Sheth G.N. and Subrahmanyam V.V.R. (1982) Melting behavior of some pure N-acyl amino acids and peptides. *Journal of the Indian Chemical Society*. 59(7):856.

James-Smith M.A., Shekhawat D. and Shah D.O. (2007) Importance of micellar lifetime and sub-micellar aggregates in detergency processes. *Tenside Surfactants and Detergents*. 44:142.

Jawed S. and Manian R. (2002) Modification of soy flour proteins for producing coagulants in papermaking and waste water treatment. Patent N° WO02056095.

Jungermann E., Gerecht J.F. and Krems I.J. (1956) The preparation of long chain N-acylamino acids. *Journal of the American Chemical Society*. 78:172.

Kabara J.J. and Haitsma G.V. (1975) Aminimides. II. Antimicrobial effect of short chain fatty acid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 52(11):444.

Kabara J.J., McKillip W.J. and Sedor E.A. (1975) Aminimides I. Antimicrobial effect of some long chain fatty acid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 52(8):316.

Kameda Y. and Toyoura E. (1952) On the hydrolysis of N-acylated amino acids by *Mycobacterium phlei*. *Yakugakuzasshi*. 72:402.

Kester E.B. (1949) N-acylated derivatives of glutamic acid and process for preparing them. Patent N° US2463779.

Larpent C. (1993) Tensioactifs. In *Techniques de l'ingénieur*. Vol. K 342, pp 1-15.

Larre C., Berot S., Sanchez-Vioque R. and Gueguen J. (2003) "Green" surfactants based on industrially-obtained rapeseed protein fractions. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*. 10(5-6):360.

Larre C., Mulder W., Sanchez-Vioque R., Lazko J., Berot S., Gueguen J. and Popineau Y. (2006) Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*. 49(1):40.

Lucassen-Reynders E.H. (1972) Surface properties of mixed anionic/cationic surfactant solutions. *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*. 250:356.

Lucassen-Reynders E.H., Lucassen L. and Giles D. (1981) Surface and bulk properties of mixed anionic/cationic surfactant systems I. Equilibrium surface tension. *Journal of Colloid and Interface Science*. 81:150.

Mathis A. (1992) Surface-active products. *Bulletin de l'Union des Physiciens*. 86(749):1487.

Mehreteab A. and Loprest F.J. (1988) Formation of pseudo-non-ionic complexe of anionic and cationic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 125(2):602.

Molinero J., Julia M.R., Erra P., Robert M. and Infante M.R. (1988) Synthesis and properties of Na-lauroyl-L-arginine dipeptides from collagen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 65(6):975.

Montet D., Servat F., Pina M., Graille J., Galzy P., Arnaud A., Ledon H. and Marcou L. (1990) Enzymic synthesis of N-e-acyllysines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 67(11):771.

Morelle J.V. (1969) Acylated protein hydrolyzates. Patent N° GB1153408.

Nagao A. and Kito M. (1989) Synthesis of O-acyl-L-homoserine by lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 66:710.

Nakamiya T., Mizuno H., Meguro T., Ryono H. and Takinami K. (1976) Antibacterial activity of lauryl ester of DL-lysine. *Journal of Fermentation Technology*. 54(6):369.

Narasimhan K., Sehgal P.K. and Joseph K.T. (1980) Condensation of aromatic sulfonic acid with hydrolysates from leather wastes. *Journal of the American Leather Chemists Association*. 75(6):211.

Noiret N., Benvegna T. and Plusquellec D. (2002) Surfactants from renewable resources. *Actualite Chimique*. 11-12:70.

Patist A., Chhabra V., Pagidipati R., Shah R. and Shah D.O. (1997) Effect of chain length compatibility on micellar stability in sodium dodecyl sulfate/alkyltrimethylammonium bromide solutions. *Langmuir*. 13:432.

Patist A., Kanicky J.R., Shukla P.K. and Shah D.O. (2002) Feature article-importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 245:1.

Patist A., Oh S.G., Leung R. and Shah D.O. (2001) Kinetics of micellization: its significance to technological processes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 173:3.

Pegiaduo S., Perez L. and Infante M.R. (1999) Synthesis, characterization and surface properties of 1-N-L-tryptofan-glycerol-ether surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 3:517.

Perez L., Garcia M.T., Ribosa I., Vinardell M.P. and Manresa A. (2002) Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environmental toxicology and chemistry*. 21(6):1279.

Perez L., Torres J.L., Manresa A., Solans C. and Infante M.R. (1996) Synthesis, Aggregation, and Biological Properties of a New Class of Gemini Cationic Amphiphilic Compounds from Arginine, bis(Arg). *Langmuir*. 12(22):5296.

Piera E., Comelles F., Erra P. and Infante M.R. (1998) New alkylamide type cationic surfactants from arginine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry*.(2):335.

Piera E., Infante M.R. and Clapes P. (2000) Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*. 70(3):323.

Pinazo A., Infante M.R., Izquierdo P. and Solans C. (2000) Synthesis of arginine-based surfactants in highly concentrated water-in-oil emulsions. *Perkin 2*.(7):1535.

Pore J. (1976) Mousses (Dispersion gaz/liquide). In *Les dispersions aqueuses, suspension, émulsions, mousses*. J. Pore, Ed. Société des publications Le Cuir: p 253.

Prabhudesai A.V. and Viswanathan C.V. (1979) Chemical synthesis of amino acid-containing lipids. I. Lipids derived from monobasic amino acids. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*. 81(5):194.

Rosen M.J. (1991) Synergism in mixtures containing zwitterionic surfactants. *Langmuir*. 7(5):885.

Rosen M.J. and Hua X.Y. (1982) Synergism in binary mixtures of surfactants. II. Some experimental data. *Journal of the American Chemical Society*. 59(12):582.

Ross J. and Miles G.D. (1941) An apparatus for comparison of foaming properties of soaps and detergents. *Oil and Soap*. 18(5):99.

Roussel C., Pina M., Graille J., Huc A. and Perrier E. (1997) Lipophilization of proteins biocatalyzed by lipases: soy protein isolates. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*. 4(4):284.

Rubingh D.N. (1979) In *Solution Chemistry of Surfactants*. K. L. Mittal, Ed. Plenum: New York, Vol. 1, p 337.

Saitou T. and Takehara M. (1978) The present and future of low irritative soap. *Yushi (Fat & Oil)*. 31:38.

Sanchez-Vioque R., Bagger C.L., Larre C. and Gueguen J. (2004) Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 271(1):220.



Sanchez-Vioque R., Bagger C.L., Rabiller C. and Gueguen J. (2001) Foaming Properties of Acylated Rapeseed (*Brassica napus* L.) Hydrolysates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 244(2):386.

Selve C., Hamdoune F., Mansuy L. and Allouch M. (1992) Non-ionic generally perfluoroalkylated alkyl lipopeptides: synthesis and properties. *Journal of Chemical Research, Synopses*.(1):22.

Sisido M., Akiyama K. and Imanishi Y. (1984) Poly( $\alpha$ -amino acids) carrying amphiphilic side chains. Synthesis, conformation, hydrophobic binding, and induced circular dichroism. *Macromolecules*. 17(9):1773.

Sokol P. (1974) Thermal condensation of fatty acids and amines with proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 52(3):101.

Stellner K.L., Amante J.C., Scamehorn F. and Harwell H. (1988) Precipitation phenomena in mixtures of anionic and cationic surfactants in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 123(1):186.

Stryer L. (1985) *La biochimie*. Paris, Flammarion.

Takehara M., Moriyuki H., Arakawa A., Yoshimura I. and Yoshida R. (1973) Surface active N-acylglutamate. III. Physicochemical properties of sodium long chain N-acylglutamates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 50(7):227.

Takehara M., Moriyuki H., Yoshimura I. and Yoshida R. (1972) Surface-active N-acylglutamate. II. Physicochemical properties of long-chain N-acylglutamic acids and their sodium salts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 49(3):143.

Takehara M., Yoshimura I., Takizawa K. and Yoshida R. (1972) Surface-active N-acylglutamate. I. Preparation of long-chain N-acylglutamic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 49(3):157.

Takizawa K. (1973) Procédé de préparation des N-w-acyl-amino-acides basiques. Patent N°JP2182089.

Utino S., Yoneda T. and Yoshimito S. (1957) *Annales Academiae Scientiarum*. 607:190.

Valivety R., Gill I.S. and Vulfson E.N. (1998) Application of enzymes to the synthesis of amino acid-based bola and gemini surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 1(2):177.

Vaughan J.R. (1951) Acylalkylcarbonates as acylating agents for the synthesis of peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 73:3547.

Xia J., Qian J. and Nnanna I.A. (1996) Synthesis and Surface Properties of Amino Acid Surfactants from Industrial Waste Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(4):975.

Xia J., Xia Y. and Nnanna I.A. **(1995)** Structure-function relationship of acyl amino acid surfactants: surface activity and antimicrobial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:867.

Yokota H., Sagawa K., Eguchi C. and M. T. **(1985)** New amphoteric surfactants derivated from lysine. I. Preparation and properties of Nε-acyllysine derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62:1716.

# **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

**CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES ..... - 74 -**

**II.1. MATERIEL..... - 74 -**

**II.2. METHODES DE CARACTERISATIONS ET D'ANALYSES ..... - 75 -**

II.2.1. MESURES DE LA TENEUR EN PROTEINE PAR DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL .....	- 75 -
II.2.2. MESURES DE LA TENEUR EN MATIERE SECHE .....	- 75 -
II.2.3. MESURES DE LA TENEUR EN MATIERE MINERALE .....	- 76 -
II.2.4. DOSAGES DES FONCTIONS AMINES LIBRES PAR METHODE OPA .....	- 76 -
II.2.5. TENEUR EN LIPIDES EXTRACTIBLES A L'HEXANE .....	- 77 -
II.2.6. DOSAGE GRAVIMETRIQUE DES COMPOSES PARIETAUX .....	- 78 -
II.2.7. ANALYSES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE .....	- 78 -
II.2.8. ANALYSES PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE .....	- 79 -

**II.3. LES SYNTHESSES ..... - 79 -**

II.3.1. LES HYDROLYSES.....	- 79 -
II.3.1.1. Les hydrolyses chimiques .....	- 79 -
II.3.1.2. Les hydrolyses enzymatiques.....	- 79 -
II.3.2. LA N-ACYLATION.....	- 80 -
II.3.2.1. La N-acylation sur les acides aminés modèles .....	- 80 -
II.3.2.2. La N-acylation des peptides .....	- 80 -
II.3.3. L'ESTERIFICATION : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES .....	- 81 -
II.3.3.1. La cationisation des molécules modèles .....	- 81 -
II.3.3.1.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide de la choline .....	- 81 -
II.3.3.1.1.1. Estérification inspirée de Takayanagi et Endo (Takayanagi and Endo 1994).....	- 81 -
II.3.3.1.1.2. Estérification inspirée de Bergfeld and al. (Bergfeld and al. 1997) .....	- 81 -
II.3.3.1.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline-2ZnCl <sub>2</sub> .....	- 82 -
II.3.3.1.2. L'estérification des fonctions carboxylates par le chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 82 -
II.3.3.1.2.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 82 -
II.3.3.1.2.2. L'estérification de l'acide N-acétylglutamique à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	- 83 -
II.3.3.2. La cationisation des formulations à base d'acides aminés .....	- 83 -

II.3.3.2.1. La cationisation des formulations à base des sels de sodium des acides N <sup>α</sup> -acylaminés .....	- 83 -
II.3.3.2.2. La cationisation des formulations à base des acides N <sup>α</sup> -acylaminés.....	- 83 -
II.3.3.3. La cationisation des formulations à base de peptides acylés.....	- 84 -
<b>II.4. MESURES DES PROPRIETES.....</b>	<b>- 85 -</b>
II.4.1. MESURES DE LA CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE (CMC).....	- 85 -
II.4.2. MESURES DES PROPRIETES MOUSSANTES .....	- 86 -
II.4.3. MESURES DES PROPRIETES EMULSIONNANTES .....	- 86 -
II.4.4. DETERMINATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE .....	- 87 -
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>- 89 -</b>

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### II.1. Matériel

L'isolat protéique de pois est fourni par la société BioSerae (Bram, France). Il s'agit de l'isolat protéique extrait de la graine du pois (*Pisum Sativum L.*).

L'Alcalase 2.4L et la Flavourzyme 500L sont des enzymes achetées chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ces deux enzymes possèdent les spécifications recommandées par la FAO-OMS pour des applications alimentaires (Conde Jose and al. 2005).

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) également connu sous le nom de laurylsulfate de sodium, est un tensioactif anionique. Le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) est un tensioactif cationique. La lécithine est un émulsifiant alimentaire naturel. Ces trois tensioactifs sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Tous les produits suivants sont achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : L-leucine (99%), L-acide glutamique (99%), L-arginine (98%), le chlorure d'octanoyle (>97%), le chlorure de décanoyle (98%), le chlorure de dodécanoyle (98%), l'acide dodécanoïque (98%), l'o-phthaldialdéhyde (OPA), le  $\beta$ -mercaptoéthanol, le phosphate de sodium, le tétraborate de sodium, le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA) (90%), la solution d'acide phosphorique à 85%, le butan-2-ol (99%), le propan-2-ol (99%), le tertiobutanol (99%), l'éthanol technique et l'acétone technique.

Les solvants deutérés D<sub>2</sub>O (99,9%) et DMSO (99,8%) sont achetés chez Eurisotop (Saint Aubin, France).

Les membranes de dialyse utilisées sont des membranes Spectra/Por<sup>®</sup> Biotech de 31 mm de diamètre avec un seuil de coupure de 100 et 500 Da.

## II.2. Méthodes de caractérisations et d'analyses

### II.2.1. Mesures de la teneur en protéine par dosage de l'azote total

Les appareils utilisés sont un système de minéralisation « 2000 » et un distillateur automatique « Kjeltex System 2200 » de la marque Tecator.

Le dosage de l'azote total est réalisé selon la méthode de Kjeldahl. Le protocole suivi est détaillé dans la norme PR NF EN ISO 24333. La teneur en protéine est ensuite calculée à partir de la quantité d'azote présente dans l'échantillon, en utilisant le facteur de conversion azote-protéine de 6,25 dans le cas des protéines de pois (Tsoukala and al. 2006).

Dans un premier temps, l'échantillon à analyser (200 mg) est minéralisé à haute température (400°C) pendant 1 h en présence de 12,5 mL acide sulfurique concentré à 72% et d'un catalyseur (2 Kjeltabs composées de 3,5 g de  $K_2SO_4$  et de 400 mg de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). La totalité de l'azote de l'échantillon est transformée en ammoniacque. Après refroidissement, 50 mL de soude à 40% sont ajoutés à l'échantillon minéralisé pour permettre la formation de l'ammoniacque. Ce dernier est alors extrait par entraînement à la vapeur et piégé dans un mélange eau/acide borique/indicateurs colorés (vert de bromocrésol et rouge de méthyle). L'ammoniacque est dosée directement par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N. A partir du volume d'acide utilisé, la quantité d'azote total de l'échantillon peut être calculée par la relation :

$$\%N = \frac{(T - B) \times N \times 14,007 \times 100}{\text{masse de l'échantillon en mg} \times \%MS} \quad \text{Équation II-1}$$

T : volume utilisé pour la titration de l'échantillon (mL)

B : volume utilisé pour la titration du blanc (mL)

N : normalité de l'acide à 4 décimales

%MS : pourcentage en matière sèche de l'échantillon

Le taux de protéines est donné par la relation suivante :

$$\%P = \%N \times 6,25 \quad \text{Équation II-2}$$

6,25 : facteur de conversion de l'azote-protéine dans le cas des protéines de pois

### II.2.2. Mesures de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche a été déterminé selon la norme Afnor NF VO3-706. Les mesures sont réalisées en duplicat. Un échantillon de 1 à 2,5 g est pesé dans un creuset en porcelaine

préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur en présence de sulfate de barium anhydre, pendant 2 h. Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation :

$$\%MS = \frac{m_{\text{sec}}}{m_i} \times 100 \quad \text{Équation II-3}$$

$m_i$  : masse de l'échantillon initial (g)

$m_{\text{sec}}$  : masse de l'échantillon sec (g) après passage dans l'étuve à 105°C

### II.2.3. Mesures de la teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale est déterminée par la perte de masse d'un échantillon d'après la norme NF V 03-922. Après la détermination du taux de matière sèche, les creusets (deux par échantillon) sont placés dans un four pendant 5 h à 550°C. Le pourcentage de matière minérale est calculé par la relation suivante :

$$\%MM = \frac{m_{\text{cendres}}}{m_{\text{sec}}} \times 100 \quad \text{Équation II-4}$$

$m_{\text{sec}}$  : masse de l'échantillon après passage à l'étuve à 105°C (g)

$m_{\text{cendres}}$  : masse de cendres issues de l'échantillon après calcination à 550°C (g)

### II.2.4. Dosages des fonctions amines libres par méthode OPA

La méthode OPA (o-phthaldialdéhyde) est utilisée pour la détermination quantitative des groupes  $\alpha$  et  $\epsilon$  aminés dans les acides aminés, peptides et protéines (Frister and al. 1988). Le mercaptoéthanol est le composé thiol le plus fréquemment utilisé. La réaction conduit à la formation d'un isoindole qui absorbe fortement à 340 nm.

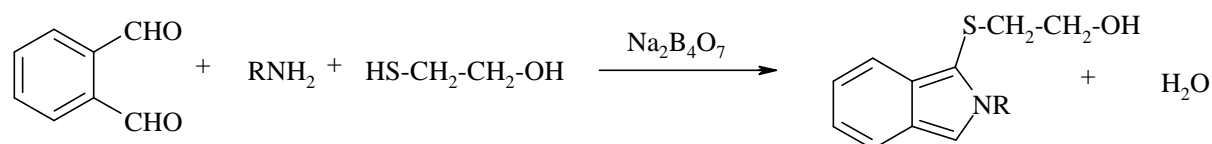


Figure II-1 : Formation du composé isoindole lors du dosage par la méthode OPA



La courbe de calibration est établie en utilisant la L-leucine (0,1 mM à 0,6 mM) comme standard.

Les réactifs de la méthode OPA sont préparés journalièrement en combinant dans une fiole de 50 mL : 25 mL de tétraborate de sodium 0,1 M (pH 9,2), 2,5 mL de solution de SDS à 20%, 40 mg d'OPA dissous dans 1 mL de méthanol, 100 µL de β-mercaptoéthanol et de l'eau permutée. 2 mL de réactif OPA et 1 mL de solution à doser contenant l'échantillon dissous dans un tampon de tétraborate de sodium 0,0125 M et de SDS à 2% sont introduits dans une cuve en quartz. La solution est mélangée rapidement et incubée pendant 2 min à température ambiante. Puis, la densité optique est lue à 340 nm à l'aide d'un spectromètre HP 8552.

Le dosage des amines libres permet de déterminer le degré d'hydrolyse des protéines (DH) (voir paragraphe II.3.1.2.) et le taux d'acylation des peptides ( $\eta_{AA}$ ) (voir paragraphe IV.2.1.2.1.).

## II.2.5. Teneur en lipides extractibles à l'hexane

Les lipides résiduels de l'isolat de protéine de pois sont extraits à l'hexane à l'aide d'un appareil de Soxhlet. Cette détermination suit la norme NF ISO 734-1.

Avant d'être utilisés, les ballons (250 mL) et les cartouches de cellulose (125 mL) sont séchés à l'étuve à 103°C. 10 g d'isolat protéique sont introduits dans la cartouche en cellulose et 150 mL d'hexane sont déposés dans le ballon. L'hexane est chauffé à reflux pendant 5 h. La quantité de lipides (triglycérides) est évaluée par pesée après évaporation à l'évaporateur rotatif et séchage de l'échantillon à l'étuve à 50°C pendant 24 h. La teneur en lipide de l'isolat protéique est ensuite calculée selon l'Equation II-5. Cette détermination s'effectue en triplicat.

$$L (\%) = \frac{m_{b1} - m_{b0}}{m_e \times \frac{MS}{100}} \times 100 \quad \text{Équation II-5}$$

L : la teneur en lipide par rapport à la matière sèche de l'échantillon (%)

$m_{b0}$  : la masse du ballon vide contenant quelques pierre ponce (g)

$m_{b1}$  : la masse du ballon contenant quelques pierres ponce et l'extrait lipidique sec (g)

$m_e$  : la masse de l'échantillon introduit dans la cartouche

MS : le pourcentage de matière sèche de l'échantillon de départ

### **II.2.6. Dosage gravimétrique des composés pariétaux**

Cette méthode gravimétrique décrite par Van Soest et Wine est connue sous le nom de la méthode ADF-NDF (Acid Detergent Fiber - Neutral Detergent Fiber) (Van Soest 1963; Van Soest and Wine 1967; Van Soest and Wine 1968). Elle permet de déterminer les teneurs en cellulose, hémicellulose et lignine de la matière végétale en se basant sur la différence de solubilité des constituants des parois cellulaires. Dans notre cas, seul le dosage global des composés pariétaux a été réalisé (dosage NDF).

Pour cela, un Fiber System M-Hot extractor est utilisé. Cet appareil, équipé d'un système de chauffage et de filtration, permet de réaliser l'enchaînement des différentes étapes de filtration et d'extraction conduisant à l'isolement ou à l'élimination des différentes fractions pariétales dans un même fritté de porosité P2 et donc sans transfert de l'échantillon à doser.

Le réactif NDF est préparé en introduisant dans une fiole jaugée d'un litre 30 g de laurylsulfate de sodium, 18,61 g d'éthylène diamine tétraacétate de sodium, 4,56 g de phosphate disodique, 6,81 g de borate de sodium décahydraté, 10 mL d'éthyl cellulose. On complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

0,8 à 1 g de matière à au moins 90% de MS est introduit dans un fritté. 100 mL de réactif NDF sont ajoutés. Le mélange est mis à reflux pendant 1 h. Le liquide est évacué par aspiration et rinçage à l'eau déminéralisée chaude. Le précipité, constitué des composés pariétaux, est séché et pesé.

### **II.2.7. Analyses par résonance magnétique nucléaire**

Les spectres RMN sont réalisés avec un équipement 7.05 Tesla Bruker AVANCE 300. Ils sont acquis à 300,13 MHz pour le proton et 75,48 MHz pour le carbone dans une sonde directe de 5 mm (PH QNP-300SB F/P/C-H-D -05 – Zgrad -BTO 2000). Les expériences sont réalisées à  $293,1 \pm 0,1$  K. L'échantillon (20 à 50 mg) est dissous dans 0,6 mL de D<sub>2</sub>O ou DMSO. Le déplacement chimique est calibré à l'aide du tétraméthylsilane (TMS) pour les noyaux <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Le spectre du proton est collecté avec une présaturation du solvant (Pulse programme <sup>1</sup>H : zgpr) avec un pulse de 90° (P1 = 12,70 µs ; PL1 = 0 dB et PL9 = 45 dB) sur une largeur de bande de 6,172 KHz, en 32 K points. Tous les spectres du carbone 13 sont acquis en utilisant un pulse standard – gradient proton-découplé carbone 13 (Pulse

programme  $^{13}\text{C}$  : zppg30) avec une longueur de pulse de 9,70  $\mu\text{s}$  (PL= -1 dB) et 18,115 KHz. Un découplage proton est appliqué pendant l'acquisition. Le nombre de scans est de 1536 pour les expériences de carbone 13 et 64 pour les analyses de proton.

## **II.2.8. Analyses par spectrométrie infrarouge**

La caractérisation infrarouge a été réalisée sur un spectromètre FTIR Perkin Elmer modèle 1600. Les spectres ont été réalisés à l'aide de pastilles de KBr des échantillons, sur 32 scans.

## **II.3. Les synthèses**

### **II.3.1. Les hydrolyses**

#### **II.3.1.1. Les hydrolyses chimiques**

2 g de protéines, 2,5 mL d'HCl à 37% et 10 mL d'eau sont placés dans un tube de 20 mL. Le tube est scellé et chauffé à 107°C pendant 48 h (Reiners and al. 1970; Dzanic and al. 1985; Jarunrattanasri and al. 2005). L'hydrolysate est filtré sur büchner. L'eau du filtrat est éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu est séché au dessiccateur sous vide à 40°C, pendant 48 h.

#### **II.3.1.2. Les hydrolyses enzymatiques**

L'isolat protéique est hydrolysé en présence d'Alcalase et/ou de Flavourzyme. L'hydrolyse est réalisée dans un ballon tricol équipé d'un pHmètre, d'un réfrigérant et d'une agitation. Différents modes d'agitation sont testés (500 tr/min) : l'agitation magnétique, mécanique, à l'aide d'un turbotest Raynerie et les ultrasons. On utilise une concentration constante de substrat (10%, w/v). La température est fixée à 50°C pendant toute la durée de l'hydrolyse. Le pH est ajusté à l'aide d'une solution de soude 4 N. Il est fixé à 8,0 pour les hydrolyses avec l'Alcalase seule, à 7,0 pour la Flavourzyme seule et à 7,5 pour le mélange des deux enzymes. On arrête l'hydrolyse par ajout d'acide chlorhydrique 4 N afin que le pH du milieu soit inférieur à 4. Le degré d'hydrolyse de l'hydrolysate protéique est déterminé par dosage OPA selon l'équation suivante :

$$DH = \frac{N_h - N_0}{N_t - N_0} \times 100 \quad \text{Équation II-6}$$

$N_T$  : quantité molaire des fonctions amines de l'hydrolysate protéique après hydrolyse totale

$N_O$  : quantité molaire des fonctions amines de l'isolat protéique non hydrolysé

$N_h$  : quantité molaire des fonctions amines de l'isolat protéique partiellement hydrolysé

### II.3.2. La *N*-acylation

#### II.3.2.1. La *N*-acylation sur les acides aminés modèles

La soude, 2,72 g (2 éq.) – sauf pour la synthèse avec l'acide glutamique 4,08 g (3 éq.) – et l'acide aminé (1 éq.) sont dissous dans 30 mL d'eau, dans un bicol de 250 mL muni d'un réfrigérant et d'une agitation mécanique (500 tr/min). Le mélange est agité à température ambiante. Une fois que l'acide aminé et la soude sont totalement dissous, le chlorure d'acide (51 mmol) est ajouté. La température du mélange réactionnel est augmentée jusqu'à 50°C, puis maintenue ainsi durant 3 h. Après refroidissement, le pH est ajusté à 2-3 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 4 N. L'eau est éliminée à l'évaporateur rotatif. 50 mL d'éthanol sont ajoutés au résidu obtenu. Ce mélange est chauffé à reflux pendant 30 min, puis filtré sous vide. Le précipité est séché à l'étuve à 50°C pendant 24 h. Le solvant du filtrat est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans une solution de soude saturée et dans 10 à 20 mL d'éthanol. Le sel de sodium de l'acide *N*<sup>a</sup>-acylaminé précipite après ajout de 20 mL d'acétone. Après filtration, ce dernier est séché au dessiccateur sous vide à 40°C, pendant 48 h.

#### II.3.2.2. La *N*-acylation des peptides

200 mL de solution aqueuse de protéine hydrolysée (10% w/v) précédemment obtenue (voir paragraphe II.3.1.2.) sont introduits dans un ballon tricol de 500 mL équipé d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant, d'un pHmètre ou dans un bécher de 500 mL équipé du Turbotest Raynerie, d'un thermomètre et d'un pHmètre. Le mélange est agité à température ambiante. Le chlorure de lauroyle (1,5 éq/NH<sub>2</sub>, les fonctions amines libres ont été préalablement dosées par la méthode OPA) est ajouté goutte à goutte pendant 30 min. Pendant l'addition, le milieu est maintenu à pH 10 par ajout de soude 4 N. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 50°C durant 3 h tout en maintenant le pH à 10. A la fin de la réaction, l'eau est éliminée soit à

l'évaporateur rotatif, puis au dessiccateur sous vide à 40°C pendant 48 h, soit par lyophilisation.

Une fraction de la formulation obtenue est dialysée. Les membranes de dialyse utilisées sont des membranes en cellulose SpectraPor de 31 mm de diamètre avec un seuil de coupure de 100 ou 500 Da (protocole de la dialyse : voir paragraphe II.3.3.2.).

### **II.3.3. L'estérification : cationisation des tensioactifs anioniques**

#### **II.3.3.1. La cationisation des molécules modèles**

##### **II.3.3.1.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide de la choline**

###### *II.3.3.1.1.1. Estérification inspirée de Takayanagi et Endo (Takayanagi and Endo 1994)*

2,43 g de chlorure de choline (1 éq.), 3 g d'acide dodécanoïque (1 éq.), 0,4 g d'une solution d'acide phosphorique à 85% (0,2 éq.) et 150 mL de solvant (toluène, acétone ou acétate d'éthyle) sont introduits dans un ballon de 250 mL muni d'un Dean Stark rempli de tamis moléculaire (4 Å), d'un thermomètre et d'une agitation mécanique. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 8 h.

A la fin de la réaction, deux phases sont récupérées, une phase soluble et une phase solide insoluble dans le solvant. Les deux phases sont séparées par filtration sur büchner. Le solvant est éliminé du filtrat à l'évaporateur rotatif sous vide. Le résidu et le produit solide sont analysés par spectroscopie IR et RMN après séchage à l'étuve à 50°C pendant 24 h.

###### *II.3.3.1.1.2. Estérification inspirée de Bergfeld and al. (Bergfeld and al. 1997)*

10 ou 20 g d'acide dodécanoïque (2,5 ou 5 éq.), 2,9 g de choline (1 éq.) et 0,3 mL d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 85% sont introduits dans un réacteur muni d'une agitation magnétique. Le mélange est chauffé à 160°C, sous vide (30 mbar) pendant 5 h. A la fin de la réaction, on observe deux phases non miscibles : la phase supérieure contenant l'acide dodécanoïque et la phase inférieure contenant la choline. Les deux phases sont séparées par décantation puis analysées par spectroscopie IR et RMN.

*II.3.3.1.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub>*

Préparation du liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub> (Abbott and al. 2001) :

5 g de ZnCl<sub>2</sub> (2 équ.) et 2,56 g de chlorure de choline (1 équ.) sont introduits dans un ballon de 50 mL, muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique. Le mélange est chauffé à 150°C jusqu'à l'obtention d'un liquide clair incolore.

Estérification dans le chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub> inspirée du protocole de Sunitha and al. (Sunitha and al. 2007) :

4,13 g d'acide dodécanoïque (1 équ.), 1 g de liquide ionique (1 équ.) et 3,35 g de choline (1 équ.) sont introduits dans un ballon de 100 mL muni d'une agitation magnétique et d'un réfrigérant. On chauffe le mélange à 110°C pendant 7 h. A la fin de la réaction, on obtient un solide beige clair qui est analysé par spectroscopie infrarouge.

**II.3.3.1.2. L'estérification des fonctions carboxylates par le chlorure de glycidyltriméthylammonium***II.3.3.1.2.1. L'estérification de l'acide dodécanoïque à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium*

Le protocole suivi est inspiré du brevet de Philippe et Compos (Philippe and Campos 1998). 10 g (1 équ.) d'acide dodécanoïque, l'hydrogénocarbonate de sodium (0,05 à 0,1 équ.) et 150 mL de solvant (du butan-2-ol, propan-2-ol ou tertibutanol) sont introduits dans un ballon tricol de 250 mL, muni d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée contenant le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA). Le milieu est porté à reflux, puis 7,6 g à 11,4 g (1 à 1,5 équ.) de GTA sont introduits goutte à goutte pendant 1 à 4 h ou en une seule fois. Le milieu est maintenu à reflux après la fin de l'ajout du GTA pendant 2 à 10 h. A la fin de la réaction, le milieu est filtré afin d'éliminer le catalyseur, non soluble dans le solvant. Ce dernier est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit est ensuite séché au dessiccateur sous vide à 60°C pendant 48 h. Les produits obtenus sont analysés par spectrométrie infrarouge et RMN. Une fraction du produit est dialysée avec une membrane de dialyse en fibres de cellulose possédant un seuil de coupure de 100 Da (protocole de la dialyse : voir paragraphe II.3.3.2.).

#### *II.3.3.1.2.2. L'estérification de l'acide N-acétylglutamique à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium*

6 g (1 éq.) d'acide N-acétylglutamique, l'hydrogénocarbonate de sodium et le solvant (du butan-2-ol, propan-2-ol ou tertibutanol) sont introduits dans un ballon tricol de 250 mL, muni d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée contenant le GTA. Le milieu est porté à reflux, puis 10,6 à 15,9 g (1 à 1,5 éq.) de GTA sont introduits goutte à goutte (1 à 3 h) ou en une seule fois. Le milieu est maintenu à reflux après la fin de l'ajout du GTA pendant 2 à 10 h. A la fin de la réaction, le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et le produit est ensuite séché au dessiccateur sous vide à 60°C pendant 48 h. Les produits obtenus sont analysés par spectrométrie infrarouge et RMN.

### **II.3.3.2. La cationisation des formulations à base d'acides aminés**

#### **II.3.3.2.1. La cationisation des formulations à base des sels de sodium des acides N<sup>α</sup>-acylaminés**

3 g (1 éq.) de sels de sodium des acides N<sup>α</sup>-dodécylaminés (mélanges acide dodécanoïque/acide N<sup>α</sup>-dodécylglutamique et acide dodécanoïque/N<sup>α</sup>-dodécylarginine) et 30 mL de butan-2-ol sont introduits dans un ballon tricol de 250 mL, muni d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée contenant 2,4 à 3,5 g de GTA (1,5 éq. par rapport au fonction carboxylates du mélange). Le milieu est porté à reflux, puis le GTA est introduit goutte à goutte pendant 3 h. Le milieu est maintenu à reflux après la fin de l'ajout du GTA pendant 1 h. Le butan-2-ol est éliminé à l'évaporateur rotatif et le produit est ensuite séché au dessiccateur sous vide à 60°C pendant 48 h. Les produits obtenus sont analysés par spectrométrie infrarouge et leur potentiel zêta est mesuré.

#### **II.3.3.2.2. La cationisation des formulations à base des acides N<sup>α</sup>-acylaminés**

3 g (1 éq.) des acides N<sup>α</sup>-acylaminés (mélanges dodécanoate de sodium/N<sup>α</sup>-acylglutamate de sodium et dodécanoate de sodium/sel de sodium de N<sup>α</sup>-acylarginine), 51 à 73 mg d'hydrogénocarbonate de sodium (0,05 éq.) et 30 mL de butan-2-ol sont introduits dans un ballon tricol de 250 mL, muni d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée contenant 2,4 à 3,5 g de GTA (1,5 éq. par rapport au fonction carboxylates du mélange). Le milieu est porté à reflux, le GTA est introduit goutte à goutte pendant 3 h. Le

milieu est maintenu à reflux après la fin de l'ajout du GTA pendant 1 h. A la fin de la réaction, le butan-2-ol est éliminé à l'évaporateur rotatif et le produit est ensuite séché au dessiccateur sous vide à 60°C pendant 48 h. Les produits obtenus sont analysés par spectrométrie infrarouge et leur potentiel zêta est mesuré.

### **II.3.3.3. La cationisation des formulations à base de peptides acylés**

5 g de la formulation de peptides acylés (DH = 32% et DA = 83%), 0,16 g d'hydrogénocarbonate de sodium (0,05 éq.) et 250 mL de butan-2-ol sont introduits dans un ballon tricol de 500 mL, muni d'une agitation mécanique, d'un réfrigérant et d'une ampoule de coulée contenant 3,2 à 32 g de GTA (1 à 10 éq. par rapport aux fonctions carboxylates). Des synthèses sont effectuées en présence d'eau afin de solubiliser le mélange tensioactif, faiblement soluble dans le butan-2-ol. Quelques mL d'eau sont introduits jusqu'à dissolution totale de la formulation à base de peptides acylés. Le milieu est porté à reflux, puis le GTA est ajouté goutte à goutte pendant 3 h. Le milieu est maintenu à reflux, sous agitation pendant 6 h. A la fin de la réaction, le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et le produit est séché au dessiccateur sous vide à 40°C pendant 48 h. Une fraction du produit est dialysée avec des membranes à dialyse en cellulose possédant des seuils de coupure de 100 ou 500 Da. Le produit à dialyser est dissous dans l'eau milli Q<sup>®</sup> (10 à 20%). Après dialyse, les échantillons sont lyophilisés. Leur potentiel zêta est mesuré.

Dialyse des échantillons :

Les membranes de cellulose SpectraPor de 31 mm de diamètre et 20 cm de longueur sont remplies à moitié afin d'éviter leur éclatement et fermées à l'aide de pinces de fermeture. Chaque boudin rempli est déposé dans un bécher contenant 1 L d'eau milli Q. Les béchers sont placés dans une chambre froide à 4°C. L'eau du bain est changée deux fois par jour pendant une semaine. Les solutions contenues dans les boudins sont recueillies et lyophilisées afin de récupérer le produit dialysé sec.

Calcul théorique du nombre de fonctions carboxylates dans 1 g de formulation à base de protéines hydrolysées (DH = 32%), acylés (DA = 83%) et lyophilisées :

Les fonctions carboxylates présentes dans le mélange proviennent :



- des fonctions carboxylates du dodécanoate de sodium :  $n_{C12}$
- des fonctions carboxylates terminales des acides aminés :  $n_t$
- des fonctions carboxylates des chaînes latérales des acides aspartique et glutamique :  $n_l$

Le dosage des fonctions amines libres par OPA d'1 g de protéines hydrolysées à 32% donne 2,74 mmol. Or le nombre de fonctions amines des lysines est très petit par rapport à celui des fonctions amines terminales. On peut donc faire l'approximation, que dans 1 g d'hydrolysate protéique le nombre de fonctions carboxylates terminales est environ égal au nombre de fonctions amines dosées par OPA, soit 2,74 mmol pour 1 g d'hydrolysate protéique. Or, pour obtenir 1 g de mélange de tensioactifs, 0,53 g d'isolat de protéine de pois est utilisé, d'où  $n_t = 0,53 \times 2,74 = 1,45$  mmol.

D'après le Tableau III-5, dans 1 g de protéine de pois, il y a 2,14 mmol d'acides aspartique et glutamique, soit dans un 1 g d'isolat contenant 82% de protéine, et 95,6% de matière sèche, on a  $2,14 \times 0,82 \times 0,956 = 1,74$  mmol d'acides aspartique et glutamique. Or pour obtenir 1 g de mélange de tensioactifs, on utilise 0,53 g d'isolat de protéine de pois. D'où,  $n_l = 0,53 \times 1,74 = 0,92$  mmol pour 1 g de mélange.

Pour obtenir 1 g de mélange, on utilise 0,47 g soit 2,15 mmol de chlorure de dodécanoyle dont 44,67% donne du dodécanoate de sodium. Donc dans un 1 g de mélange de tensioactifs, on a 1,05 mmol de dodécanoate de sodium, soit  $n_{C12} = 1,05$  mmol.

Le nombre moyen de fonction carboxylate dans 1 g de mélange à base de peptides acylés (DH = 32% et DA = 83%) est de  $n_{C12} + n_l + n_t = 3,43$  mmol. En réalité 1 g d'hydrolysate acylé contient également du chlorure de sodium et des enzymes résiduels. Ce calcul surestime donc la quantité de fonctions carboxylates. Il s'agit d'un calcul approximatif permettant d'estimer la quantité de GTA à introduire pour la cationisation.

## II.4. Mesures des propriétés

### II.4.1. Mesures de la concentration micellaire critique (CMC)

La tension de surface est mesurée à l'aide d'un tensiomètre GBX-TEN 089 équipé d'une lame de platine de Wilhelmy. Les tensioactifs (2,5 g/L) sont dissous dans une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,0. Cette solution est additionnée par ajouts successifs de

40 µL, à 50 mL de la même solution de tampon phosphate. La tension de surface est mesurée et enregistrée en continu à 20°C. La CMC est obtenue au point de rupture de la courbe : tension de surface en fonction du logarithme décimal de la concentration du mélange.

### II.4.2. Mesures des propriétés moussantes

Les propriétés moussantes sont mesurées à l'aide de la méthode décrite par Padmashree and al. (Padmashree and al. 1987). 3 g de tensioactifs sont mélangés à 300 mL d'eau dans une éprouvette graduée d'1 L. La suspension est agitée à 1600 tr/min pendant 5 min à l'aide du Turbotest Raynerie. Le volume est mesuré 30 s après l'agitation. La capacité moussante (CM) est exprimée en pourcentage de volume (liquide + mousse) en utilisant la formule suivante :

$$CM = \frac{\text{Volume après agitation} - \text{Volume avant agitation}}{\text{Volume avant agitation}} \times 100 \quad \text{Équation II-7}$$

Le volume de mousse est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après agitation. La stabilité moussante (SM) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$SM = \frac{\text{Volume de la mousse après un temps "t"}}{\text{Volume de mousse initial}} \times 100 \quad \text{Équation II-8}$$

### II.4.3. Mesures des propriétés émulsionnantes

Les propriétés émulsifiantes sont mesurées en utilisant une méthode inspirée de celle décrite par Yasumata and al. (Yasamatsu and al. 1972). Les tensioactifs (1,25 g) sont homogénéisés avec 50 mL d'eau pendant 30 s, avec un homogénéiseur Ultra Turax à 11 000 tr/min. De l'huile de tournesol (25 mL) est ajoutée à chaque échantillon, et le mélange est homogénéisé de nouveau à 11 000 tr/min pendant 90 s. Le volume de l'émulsion est mesuré 30 s après l'homogénéisation. La capacité émulsionnante (CE) est exprimée en pourcentage de volume en utilisant la formule suivante :

$$CE = \frac{\text{Volume de l'émulsion après agitation}}{\text{Volume total avant agitation}} \times 100 \quad \text{Équation II-9}$$

Les émulsions obtenues sont ensuite divisées de façon égale dans 3 tubes. Le volume de l'émulsion est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après homogénéisation. La stabilité émulsionnante (SE) est exprimée en pourcentage de volume en utilisant la formule suivante :

$$SE = \frac{\text{Volume de l'émulsion après un temps "t"}}{\text{Volume initial de l'émulsion}} \times 100 \quad \text{Équation II-10}$$

#### II.4.4. Détermination de la mobilité électrophorétique

Les mesures de la mobilité électrophorétique ont été effectuées au Laboratoire de Génie Chimique (LGC – UMR5503 CNRS-UPS-INPT) à l'aide d'un appareil *Zetasizer 4* (Malvern). La mesure du potentiel  $\zeta$  permet d'évaluer la charge de surface des colloïdes ainsi que leur stabilité. En effet, les particules sont considérées comme stables si leur potentiel est supérieur à +30 mV ou inférieur à -30 mV (Malvern Instruments).

La mobilité électrophorétique pour une particule chargée soumise à un champ électrique est définie par :

$$u_E = \frac{v_{eo}}{E} \quad \text{Équation II-11}$$

$v_{eo}$  : vitesse maximale de la particule ( $\text{m.s}^{-1}$ )

$E$  : champ électrique ( $\text{V.m}^{-1}$ )

L'unité de mobilité la plus couramment utilisée est le  $\mu\text{m.cm.V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ .

Afin de connaître la charge de surface à partir des mesures de mobilités électrophorétiques, certaines hypothèses sont nécessaires (Hunter 1981) :

- le solide ou la micelle est supposé de forme sphérique ou cylindrique
- le liquide est assimilé à un liquide newtonien
- les particules sont suffisamment petites pour négliger les forces de gravité
- les déplacements sont suffisamment lents pour négliger la turbulence ainsi que les effets non linéaires.

Dans ce modèle, il est nécessaire d'introduire un plan de cisaillement correspondant à une surface imaginaire à l'intérieur de laquelle le liquide entourant la particule migre avec elle. Cette surface est supposée avoir un potentiel électrostatique constant appelé potentiel zêta  $\zeta$ . L'équation de Poisson-Boltzman décrit la distribution du potentiel en supposant que :

- les ions sont des charges ponctuelles
- le liquide est un milieu continu caractérisé par sa seule permittivité indépendante du champ appliqué

- le travail exercé pour déplacer la particule en un point où le potentiel électrostatique est  $\psi$ , est le travail électrique.

L'intégration de cette équation -entre un point éloigné du solide pour lequel  $\psi = 0$  et  $v = v_{eo}$  et le plan de cisaillement où  $\psi = \zeta$  et  $v = 0$  et en supposant le liquide figé et le déplacement de la particule inverse- conduit à deux équations : l'équation de Smoluchowski et l'équation de Hückel. Ces équations se réfèrent à des particules de tailles différentes. Ainsi le paramètre déterminant pour choisir l'une ou l'autre est  $\kappa.r$  où  $r$  est le rayon de la particule et  $\kappa$  le paramètre de Debye-Hückel,  $1/\kappa$  représentant l'épaisseur de la double couche.

Pour les valeurs  $\kappa.r \gg 1$ , l'équation de Smoluchowski s'applique (Hunter 1981) :

$$u_E = \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta}{\eta} \quad \text{Équation II-12}$$

$\epsilon_0$  : permittivité du vide soit  $8,84.10^{-12}$  F.m

$\epsilon$  : constante diélectrique du milieu

$\zeta$  : potentiel zêta (V)

$\eta$  : viscosité dynamique (Pa.s)

Dans le cas des  $\kappa.r \ll 1$ , il faut considérer l'équation de Hückel :

$$u_E = \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta}{3 \eta} \quad \text{Équation II-13}$$

Avant chaque série d'analyse, l'appareil est contrôlé avec une solution étalon (Zeta potentiel transfert solution) dont la valeur est  $-50 \pm 5$  mV à 25°C. Les mesures de potentiel  $\zeta$  sont réalisées 5 fois à l'aide de 50 mL de solution de tensioactifs à 500 mg/L.

## BIBLIOGRAPHIE

Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Munro H.L., Rasheed R.K. and Tambyrajah V. (2001) Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*.(19):2010.

Bergfeld M., Ahrens H. and Carstens A. (1997) Esterification method and oxyacid catalysts for the preparation of esterquats derived from hydroxyalkyl quaternary ammonium salts. Patent N° EP9747588.

Conde Jose M., Escobar Maria del Mar Y., Pedroche Jimenez Justo J., Rodriguez Francisco M. and Rodriguez Patino Juan M. (2005) Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20):8038.

Dzanic H., Mujic I. and Sudarski-Hack V. (1985) Protein hydrolyzates from soy grits and dehydrated alfalfa flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33(4):683.

Frister H., Meisel H. and Schlimme E. (1988) OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie*. 330(7):631.

Hunter R.J. (1981) Zeta potentiel in colloid science: principles and applications. London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press.

Jarunrattanasri A., Cadwallader K.R. and Theerakulkait C. (2005) Aroma and amino acid composition of hydrolyzed vegetable protein from rice bran. *ACS Symposium Series*. 905(Process and Reaction Flavors):83.

Padmashree T.S., Vijayalakshmi L. and Puttaraj S. (1987) Effect of the traditional processing on the functional properties of cowpea (*Vigna catjang*) flour. *Journal of Food Science and Technology*. 24:221.

Philippe M. and Campos A. (1998) Procédé de préparation de dérivés d'ammoniums quaternaires hydroxypropyles à fonction ester d'acide gras. Patent N° EP0847935.

Reiners R.A., Morgan R.E. and Shroder J.D. (1970) Amino acid composition of the protein in commercial corn starch. *Cereal Chemistry*. 47(2):205.

Sunitha S., Kanjilal S., Reddy P.S. and Prasad R.B.N. (2007) Liquid-liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride.2ZnCl<sub>2</sub>. *Tetrahedron Letters*. 48(39):6962.

Takayanagi Y. and Endo M. (1994) Manufacture of unsaturated quaternary ammonium salts. Patent N° JP06279371.

Tsoukala A., Papalamprou E., Makri E., Doxastakis G. and Braudo E.E. (2006) Adsorption at the air-water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 53:203.

Van Soest P.J. (**1963**) Use of detergent in the analysis of fibrous feeds: a rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the American Chemical Society*. 46:829.

Van Soest P.J. and Wine R.H. (**1967**) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: determination of plant cell wall constituents. *Journal of the American Chemical Society*. 50:50.

Van Soest P.J. and Wine R.H. (**1968**) Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of the American Chemical Society*. 51(4):780.

Yasamatsu K., Sawada K., Moritaka S., Misaki M., Toda J., Wada T. and Ishii K. (**1972**) Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36(5):719.

**CHAPITRE III :**  
**CARACTERISATION ET**  
**HYDROLYSE DE L'ISOLAT**  
**PROTEIQUE DE POIS**

**CHAPITRE III : CARACTERISATION ET HYDROLYSE DE L'ISOLAT**

**PROTEIQUE DE POIS ..... - 93 -**

**III.1. INTRODUCTION ..... - 93 -**

**III.2. POURQUOI LES PROTEINES DE POIS ?..... - 93 -**

III.2.1. LES CRITERES DE CHOIX ..... - 93 -

III.2.2. LES SOURCES PROTEIQUES ..... - 94 -

III.2.3. LES PROTEINES DE POIS ..... - 96 -

**III.3. CARACTERISATION DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE POIS ..... - 99 -**

III.3.1. COMPOSITION DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE POIS ..... - 99 -

III.3.2. COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PROTEINE DE POIS ..... - 101 -

III.3.3. SOLUBILITE DES PROTEINES DE POIS ..... - 102 -

III.3.4. EVALUATION DE LA QUANTITE DE GROUPES AMINES LIBRES DANS LES PROTEINES... - 103 -

**III.4. L'HYDROLYSE DES PROTEINES DE POIS ..... - 104 -**

III.4.1. INTRODUCTION ..... - 104 -

III.4.2. L'HYDROLYSE TOTALE PAR CATALYSE ACIDE ..... - 106 -

III.4.3. L'HYDROLYSE PARTIELLE PAR CATALYSE ENZYMATIQUE..... - 107 -

III.4.3.1. Etat de l'art de l'hydrolyse par catalyse enzymatique des protéines végétales- 107 -

III.4.3.2. Influence du mode d'agitation ..... - 113 -

III.4.3.3. Etude de la cinétique de la réaction ..... - 114 -

III.4.3.4. Influence du mode d'introduction des enzymes..... - 116 -

III.4.3.5. Influence du ratio enzyme/substrat (E/S)..... - 117 -

III.4.3.6. Etude de la répétabilité de l'hydrolyse..... - 120 -

**III.5. CONCLUSION GENERALE..... - 121 -**

**BIBLIOGRAPHIE ..... - 124 -**



## **CHAPITRE III : CARACTERISATION ET HYDROLYSE DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE POIS**

### **III.1. Introduction**

Dans la construction d'un tensioactif lipopeptidique, la taille et la nature du peptide constituant la tête hydrophile sont des paramètres fondamentaux. La détermination de la composition en acides aminés et, par voie de conséquence, le choix de la protéine en amont, constitue la première étape clé à réaliser.

Vient ensuite la caractérisation de cette matière première. En effet, l'identification des acides aminés constitutifs, et donc la connaissance des groupes fonctionnels présents, permettra de déterminer le type de transformations enzymatiques ou chimiques à mettre en œuvre.

Par ailleurs, la présence de fractions non protéiques au sein de l'isolat, devra être déterminée afin d'anticiper d'éventuelles interactions, lors des étapes de synthèses et de traitements ultérieurs.

Enfin, les conditions d'hydrolyse de la protéine, en vue d'obtenir la partie peptidique du tensioactif recherché, devront être étudiées et quantifiées. Les peptides obtenus seront utilisés ultérieurement pour la synthèse des tensioactifs désirés.

### **III.2. Pourquoi les protéines de pois ?**

#### **III.2.1. Les critères de choix**

Il existe de nombreuses sources de protéines dans le monde animal et végétal. Pour des raisons de risques pathologiques les sources de protéines d'origine animales ont été écartées.

Deux sources de protéines végétales ont été envisagées : les plantes de grandes cultures et les algues issues de l'aquaculture.

Les algues représentent une source riche en protéine puisque leur matière sèche peut contenir plus de 70% de protéine, pour l'algue bleue-verte (Cyanophyta, MK89100), par exemple (McArdle and al. 1994). Les algues aquatiques sont de véritables filtres à eau. Elles sont ainsi d'excellents bio-accumulateurs de métaux, tels que le plomb, l'arsenic, le cadmium, le

mercure... Leur teneur en métaux dépend fortement de leur milieu (Meylan 2006). Cette propriété essentielle, largement exploitée dans le traitement de l'eau, représente un obstacle majeur dans notre étude, en raison des applications visées dans nos travaux. Nous avons donc écarté cette source protéique.

**La source protéique devra donc être issue d'une plante de grande culture, dont la teneur en protéine doit être la plus importante possible. L'un des objectifs de notre travail est l'obtention de tensioactifs cationiques. Pour cela, les protéines doivent être constituées de la plus grande teneur possible en acides aminés basiques tel que l'histidine et l'arginine. En effet, le caractère basique des lysines sera perdu lors de l'acylation ultérieure des peptides. Par ailleurs, dans un contexte de développement durable, nous avons privilégié les légumineuses qui ne nécessitent pas d'apport d'azote. De plus, nous n'envisageons pas de réaliser l'extraction des protéines. L'isolat protéique devra donc être disponible commercialement.**

### **III.2.2. Les sources protéiques**

Nous avons tout d'abord dressé un état des lieux de la teneur en protéine de diverses plantes cultivées, en prenant en compte leurs pourcentages en acides aminés basiques. Trois grandes familles ont été considérées : les céréales, les oléagineux et les légumineuses (Tableau III-1).

	protéine / MS (%)	his+arg / protéines (%)	Références
<b>céréales</b>	9,0 à 15,0	6,2 à 9,7	(Sosulski and Imafidon 1990)
	13,10	7,1	(INRA 1984)
blé		8,1	(Reiners and al. 1970)
		10,8	(McDermott and Pace 1960)
avoine	11,6	8,8	(INRA 1984)
maïs	10,0	7,1	(INRA 1984)
riz	10,0	10,6	(Mosse and al. 1988)
<b>oléagineux</b>	20,0 à 40,0	8,4 à 11,1	(Sosulski and Imafidon 1990)
colza	21,6	8,8	(INRA 1984)
tournesol	17,7	11,1	(INRA 1984)
<b>légumineuses</b>	20,0 à 40,0	9,0 à 13,8	(Sosulski and Imafidon 1990)
pois	25,6	11,0	(INRA 1984)
féverole	30,3	11,9	(INRA 1984)
lupin blanc doux	41,0	12,9	(INRA 1984)
soja	41,0	10,1	(INRA 1984)
luzerne	16,0 à 22,0	8,8	(Nagy and al. 1978)

**Tableau III-1 : Teneur en protéine et en arginine et histidine de graines de plantes cultivées**

Les légumineuses sont les plantes les plus riches en protéines. Le soja est principalement cultivé aux Etats-Unis et en Argentine. Sa culture a de plus en plus recours aux variétés génétiquement modifiées, dont l'impact environnemental et sanitaire est controversé. C'est pour ces raisons que nous avons écarté cette source. Par ailleurs, les isolats protéiques de féverole et de lupin ne sont pas disponibles commercialement.

**Nous avons donc choisi le pois. Avec une concentration en protéine qui atteint plus de 25% et avec 11% d'arginine et d'histidine, il est une source protéique intéressante pour notre étude.** L'isolat de pois est par ailleurs disponible commercialement (Cosucra, Roquette, BioSerae). Il est de haute pureté : 82% en protéine, fruit d'une extraction douce, sans emploi

de solvant ou d'acide. En effet, après un premier traitement mécanique, au cours duquel les graines sont nettoyées, écosées et broyées, les protéines sont extraites de la farine à l'aide d'un tampon, généralement phosphate, à pH 7, NaCl 1 M. Elles sont ensuite précipitées par addition de sulfate d'ammonium à 70% de saturation, puis redissoutes en tampon phosphate 0,2 M NaCl (Guéguen 1990). Elles sont finalement séchées par atomisation et tamisées.

L'isolat protéique de pois est essentiellement utilisé dans les compléments alimentaires, car il possède un profil d'acides aminés recommandé pour les adultes par la FAO (Food and Agriculture Organization).

### **III.2.3. Les protéines de pois**

Les protéines sont extraites des graines de pois. Leur masse molaire moyenne est comprise entre 140 et 180 kDa. Elles présentent un point iso-électrique proche de 4. Elles sont principalement constituées par trois grandes familles : les albumines (21%), les globulines (66%) et les protéines dites « insolubles », les glutélines (12%) (Figure III-1). Les deux premières sont caractérisées par leur solubilité dans l'eau et en milieu salin, respectivement (Crevieu-Gabriel 1999).

Les globulines sont les principales protéines de réserve de la plante. Elles sont localisées dans les corps protéiques qui sont des organites cellulaires entourés d'une membrane (Wenzel and al. 1993). Elles sont constituées de légumine de type 11S, de la viciline et de la conviciline. Ces deux dernières sont de type 7S. La viciline de pois est une glycoprotéine de poids moléculaire d'environ 150 kDa contenant 0,9 à 1,4% de résidus osidiques. Cette protéine est un trimère de sous-unité 50 kDa. La structure de cette protéine est stabilisée par des interactions de faible énergie. La conviciline est une protéine proche de la viciline de masse moléculaire comprise entre 150 et 200 kDa. Sa composition en acide aminé est voisine de la viciline, mais contrairement à celle-ci, elle contient des acides aminés soufrés et n'est pas glycosylée. C'est une protéine de structure trimérique dont les sous-unités ont une masse moléculaire de 68,2 kDa. Les légumine sont des hexamères de masse moléculaire comprise entre 350 et 400 kDa. Chaque sous-unité est constituée d'un polypeptide acide  $\alpha$  d'environ 40 kDa et d'un polypeptide basique  $\beta$  d'environ 20 kDa, liés par un pont disulfure. Les sous-unités sont rassemblées dans l'hexamère, en une structure compacte. Les polypeptides  $\alpha$ , beaucoup moins hydrophobes que les polypeptides  $\beta$ , sont situés à l'extérieur de la molécule. La structure secondaire de la légumine est riche en feuillets  $\beta$  (Subirade and al. 1994). Les

monomères des légumineuses auraient une structure similaire aux monomères de la protéine 7S. L'hexamère de la protéine 11S serait constitué de la superposition de deux trimères du type de la protéine 7S (Lawrence and al. 1994).

Les albumines sont des protéines fonctionnelles de type 2S à faible masse moléculaire. Elles sont riches en lysine et en acides aminés soufrés, particulièrement en méthionine. La fraction albumine est constituée de molécules ayant un rôle fonctionnel dans la graine (enzymes, défense de la plante). On distingue deux albumines majeures, appelées PA1 et PA2, et d'autres albumines présentes en quantités plus faibles, comme les inhibiteurs trypsiques et les lectines. L'albumine PA1 et les lectines sont localisées dans le corps protéique (Higgins and al. 1986), alors que l'albumine PA2 et les inhibiteurs trypsiques sont localisés dans le cytoplasme (Mikola 1983; Gruen and al. 1987). L'albumine PA1, très riche en acides aminés soufrés, a une masse moléculaire de 11 kDa et contiendrait deux polypeptides de 6 kDa, suggérant une conformation dimérique. Mais cette fraction pourrait être aussi composée de deux protéines PA1a (6 kDa) et PA1b (4 kDa). L'albumine PA2 comprend deux formes de protéines : celle de masse moléculaire la plus élevée, 53 kDa, appelée PA2a, et celle de masse moléculaire plus faible, 48 kDa, appelée PA2b. La structure secondaire de ces protéines est riche en feuillets  $\beta$  (49%). Ce sont des dimères de sous-unités de 26 kDa. Chaque sous-unité possède trois cystéines, dont deux sont liées par un pont disulfure, leur conférant une structure compacte. Leur rôle biologique n'est pas élucidé.

Les glutélines ont une composition polypeptidique très similaire à celle des protéines solubles mais du fait de leur insolubilité, elles sont peu étudiées (Crévieu and al. 1996).

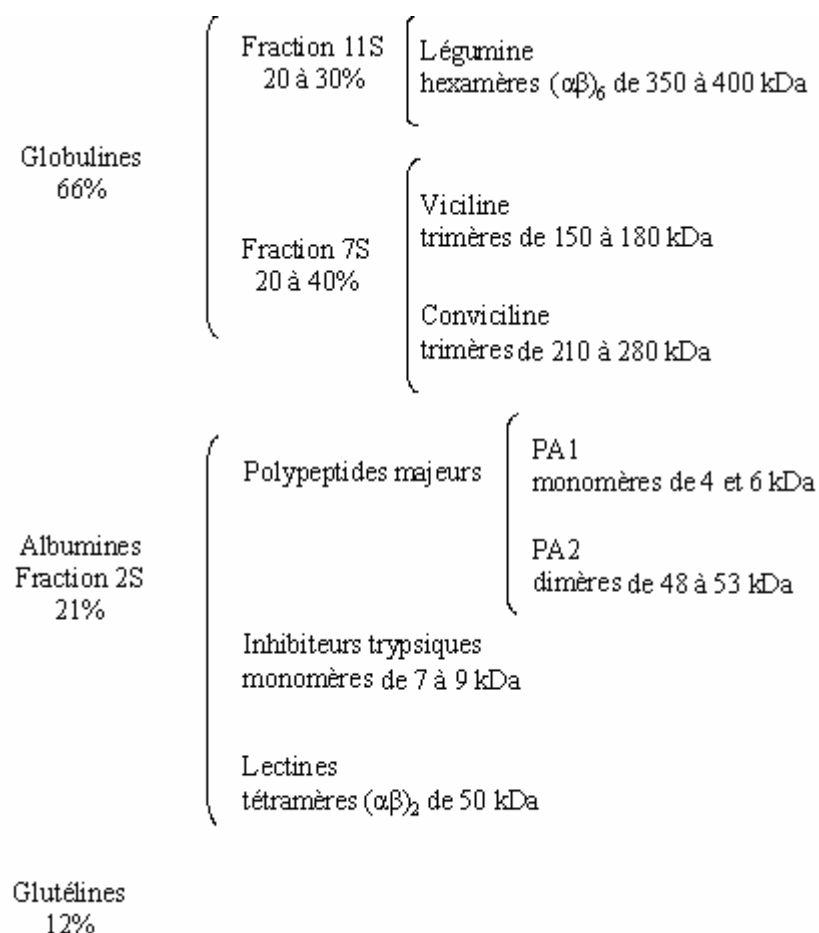


Figure III-1 : Classification des protéines de pois (Guéguen and Cerletti 1994)

La culture du pois présente de nombreux avantages. Elle ne nécessite pas l'apport d'engrais azoté car, comme toutes les légumineuses, le pois fixe l'azote de l'air, ce qui représente une économie importante. De plus, cultiver du pois avant une céréale permet d'améliorer le rendement de cette dernière. En outre, le pois ne fait pas partie de la liste des allergènes majeurs nécessitant un étiquetage spécifique (Arômes 2007).

La France se place comme premier producteur de protéagineux de l'Union Européenne avec 426 000 ha, dont 318 000 ha consacrés à la culture du pois, en 2005. Cette même année, le rendement de cette culture se chiffrait à 41,9 q/ha (Proléa 2008).

### III.3. Caractérisation de l'isolat protéique de pois

#### III.3.1. Composition de l'isolat protéique de pois

L'isolat protéique de pois est constitué à 95,6% de matière sèche, dont 81,9% de protéines. Les autres constituants sont essentiellement des oligosaccharides (8,7%<sup>\*</sup>), de la matière minérale (7,1%) et, en très faible proportion, des lipides (2,3%). Les extractions par la méthode ADF-NDF n'ont pas révélé la présence de fibres au sein de l'isolat protéique. Ces différentes valeurs, obtenues expérimentalement, sont en accord avec les données du fournisseur, excepté celle de la teneur en matière minérale (Tableau III-2).

	Valeurs fournies par BioSerae (%)	Valeurs expérimentales (%)
matière sèche	95,9	95,6
protéines	82,6	81,9
matière minérale	3,2	7,15
lipides	<3	2,3
fibres	non renseigné	0,0
oligosaccharides	11,9	8,7
total	<100,7	100,0

**Tableau III-2: Bilan matière de la composition totale de l'isolat protéique de pois**

Les cendres sont principalement composées de phosphore et de sodium (Tableau III-3).

<sup>\*</sup> Valeur obtenue par le calcul

---

calcium	0,03%
phosphore	0,85%
sodium	0,60%
potassium	0,10%
fer	150 ppm
zinc	32 ppm
mercure	<10 ppb
plomb	<10 ppm
cadmium	<1 ppm
arsenic	<10 ppm

---

**Tableau III-3 : Composition de l'isolat protéique en minéraux et métaux lourds**

La composition des différents oligosaccharides a été fournie par la société BioSerae (Tableau III-4). La fraction oligosaccharidique est principalement constituée de sucrose, raffinose, stachyose et verbascose. Le stachyose est un tétrasaccharide constitué de deux unités D-galactose et un saccharose liées séquentiellement. Le raffinose est un triholoside composé d'une unité de galactose, d'une unité de glucose et d'une unité de fructose. Le sucrose ou saccharose est un sucre double formé par la condensation d'une molécule de D-glucose et d'une molécule de D-fructose. Le verbascose est un pentose constitué de 3 unités D-galactose, une unité D-glucose et une unité D-fructose.



oligosaccharides	teneur (% / MS)
sucrose	2,2
raffinose	1,1
stachyose	4,0
verbascose	3,9
fibres digestibles	0,0
amidon	0,7

**Tableau III-4 : Teneur en oligosaccharides de l'isolat protéiques de pois****III.3.2. Composition en acides aminés de la protéine de pois**

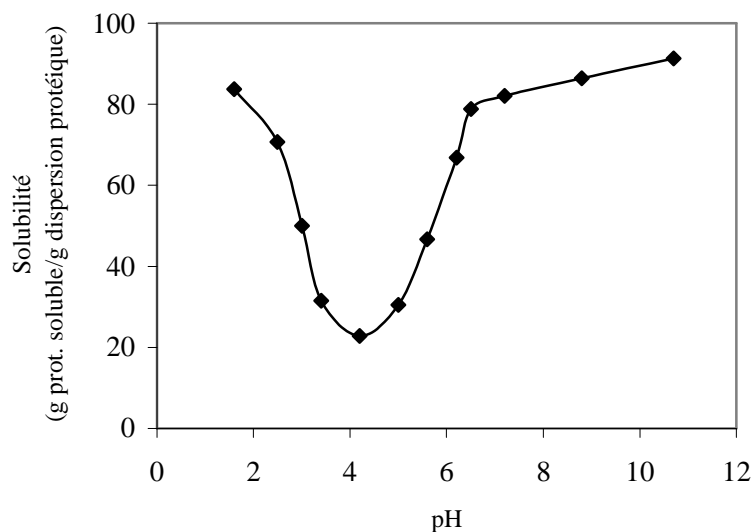
La composition moyenne en acides aminés des protéines de pois a été fournie par la société BioSerae (Tableau III-5). Outre la richesse en acides aminés basiques, les protéines de pois, comme toutes les protéines végétales, sont riches en acides aminés glutamique et aspartique. Leurs fonctions acides carboxyliques nombreuses pourront donc être exploitées en vue d'obtenir une nouvelle famille de tensioactifs.

acides aminés	g d'acides aminés/100 g de protéines BioSerae	n d'acides aminés/g de protéines (mmol)	% de l'acide aminé dans les protéines
<b>acide aspartique</b>	<b>12,43</b>	<b>1,08</b>	<b>11,95</b>
thréonine	4,34	0,43	4,75
serine	4,8	0,55	6,10
<b>acide glutamique</b>	<b>13,74</b>	<b>1,06</b>	<b>11,78</b>
proline	5,29	0,54	6,03
cystine	0,76	0,03	0,38
glycine	4,64	0,81	9,00
alanine	5,04	0,71	7,85
valine	5,27	0,53	5,88
méthionine	1,31	0,10	1,11
isoleucine	5,59	0,49	5,47
leucine	8,44	0,75	8,25
tyrosine	3,12	0,19	2,12
phénylalanine	6,13	0,42	4,61
lysine	6,82	0,53	5,89
<b>histidine</b>	<b>2,52</b>	<b>0,18</b>	<b>2,03</b>
<b>arginine</b>	<b>8,71</b>	<b>0,56</b>	<b>6,17</b>
tryptophane	1,06	0,06	0,63

Tableau III-5 : Composition en acides aminés de l'isolat protéique de pois

### III.3.3. Solubilité des protéines de pois

L'isolat de protéines de pois est très soluble dans l'eau à pH 2 et aux pH égaux et supérieurs à 7,0, mais peu soluble à pH 4, qui correspond au point isoélectrique des protéines. La courbe du pourcentage de solubilité est donnée par BioSerae (Figure III-2).



**Figure III-2 : Solubilité des protéines de pois (g de protéines solubles/g de dispersion protéique) en fonction du pH**

### **III.3.4. Evaluation de la quantité de groupes amines libres dans les protéines**

L'évaluation de la quantité de groupements amines libres au sein des protéines est indispensable pour déterminer avec précision non seulement les degrés d'hydrolyse (DH) et donc évaluer la taille moyenne des peptides obtenus (paragraphe II.3.1.2.), mais également les taux d'acylation, lors de la mise en œuvre de la réaction de Shotten-Baumann (Chapitre IV).

D'après la masse molaire moyenne des protéines de pois (160 000 g/mol) et le nombre de lysine dans la protéine (5,89%), le nombre de fonctions amines libres moyen théorique est de 0,54 mmol/g de protéine. La détermination expérimentale, effectuée en triplicat, donne une valeur de  $0,45 \pm 0,01$  mmol de  $\text{NH}_2$ /g d'isolat protéique soit  $0,57 \pm 0,01$  mmol de  $\text{NH}_2$ /g de protéine. Un écart faible de 5,75%, entre la valeur théorique obtenue par le calcul et la valeur expérimentale, est donc observé. Cet écart est essentiellement dû à l'utilisation d'une masse molaire « moyenne » des protéines de pois lors des calculs.

La masse moyenne pondérée des acides aminés de la protéine a été calculée selon l'équation suivante :

$$M_{AAmoy} = \sum_i x_i \times (M_{AAi} - M_{H_2O}) \quad \text{Équation III-1}$$

$M_{AAmoy}$  : masse molaire moyenne des acides aminés de la protéine (g/mol)

$x_i$  : pourcentage molaire de l'acide aminé i dans la protéine

$M_{AAi}$  : masse molaire de l'acide aminé i (g/mol)

$M_{H_2O}$  : masse molaire d'une molécule d'eau, soit 18,00 g/mol

La masse molaire moyenne des protéines de pois ( $M_p = 160\,000$  g/mol) et la masse moyenne pondérée des acides aminés de la protéine ( $M_{AAmoy} = 118,40$  g/mol) permettent de calculer le nombre moyen d'acides aminés dans une protéine grâce à la relation :

$$n_{AAmoy} = \frac{M_p}{M_{AAmoy}} \quad \text{Équation III-2}$$

Le nombre moyen calculé d'acides aminés dans la protéine est donc de 1351.

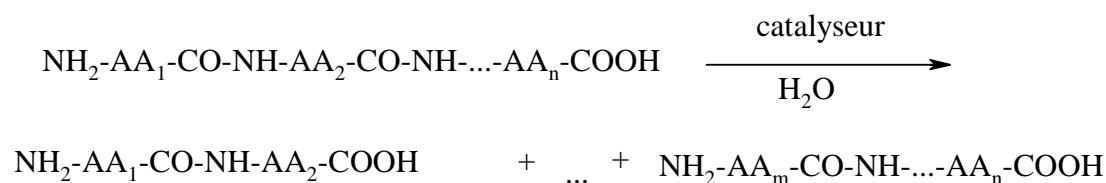
	Valeur théorique ou donnée par BioSerae	Valeur expérimentale
Nombre moyen d'acides aminés dans la protéine	1351	
Masse molaire moyenne d'un acide aminé de la protéine (g/mol)	118,40	
Quantité de $NH_2$ dans les protéines (mmol/g)	0,54	0,57

**Tableau III-6 : Evaluation de la quantité des groupements amines dans les protéines de pois**

## III.4. L'hydrolyse des protéines de pois

### III.4.1. Introduction

Pour obtenir les peptides qui constitueront la tête hydrophile des tensioactifs, à partir d'un isolat protéique, nous devons effectuer l'hydrolyse partielle des protéines de pois. L'hydrolyse peut être catalysée par voie enzymatique, à l'aide de protéase, ou par voie chimique (généralement, par hydrolyse acide).



**Figure III-3 : Hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines de pois**

La modification enzymatique des protéines, via l'utilisation de protéases sélectionnées, pour couper des liaisons peptidiques, plus ou moins spécifiques, est largement utilisée, en particulier dans l'industrie alimentaire (Adler-Nissen 1986; Pommer 1995; Conde Jose and al. 2005). En effet, l'hydrolyse enzymatique est réalisée dans des conditions plus douces que l'hydrolyse par catalyse acide ou basique, permettant ainsi un meilleur contrôle du taux d'hydrolyse de la protéine. En effet, l'hydrolyse chimique requiert une concentration en acide chlorhydrique supérieure à 5 N et des températures comprises entre 100 et 110°C, alors que l'hydrolyse enzymatique a lieu à pH proche de la neutralité et à des températures comprises entre 40 et 70°C, en fonction de l'enzyme utilisée. De plus, au cours de l'hydrolyse acide, des composés cancérogènes, tels que des mono- et dichloropropanols et des monochloropropanediols, peuvent être produits (Nagodawithana 1994). Lors de l'hydrolyse enzymatique, il n'y a pas de réaction secondaire, ni d'apparition de coproduit. De plus, elle préserve les acides aminés chimiquement sensibles tels que les tryptophanes, méthionines, thréonines, et lysines. L'hydrolysats final, après neutralisation, contient moins de sels minéraux que celui obtenu par une hydrolyse acide (écart de 40% environ) (Manley and al. 1981). Le degré d'hydrolyse (DH) peut être contrôlé grâce à l'utilisation d'enzymes spécifiques et au suivi des paramètres de réaction. Enfin, les hydrolysats acides sont généralement marrons foncés et ont une odeur et une saveur fortes, tandis que les hydrolysats enzymatiques sont, généralement, faiblement colorés et ont une odeur et saveur moins prononcées (Weir 1992). L'odeur des hydrolysats acides est généralement due aux acides aminés libres, peptides, sels et aux nombreux composés volatils. En effet, les acides aminés libres sont des précurseurs de réactions de Maillard, ce qui augmente de façon significative la gamme des composés odorants volatils (Aaslyng and al. 1998). Pour toutes ces raisons, l'hydrolyse par catalyse enzymatique a été privilégiée.

Cependant, l'hydrolyse chimique a été utilisée afin de réaliser l'hydrolyse totale des protéines. La rupture de toutes les liaisons peptidiques permet de déterminer leur nombre dans la protéine, via un dosage des fonctions amines libres, avant et après hydrolyse totale des protéines. Cette donnée est indispensable pour déterminer le degré d'hydrolyse (voir paragraphe II.3.1.2.).

**Nous souhaitons obtenir des têtes hydrophiles d'une taille moyenne comprise entre 3 et 5 acides aminés, ce qui correspond à un degré d'hydrolyse moyen de 20 à 33%. En effet, il est nécessaire d'obtenir des peptides suffisamment petits (ou oligopeptides) pour conférer un caractère amphiphile à nos tensioactifs (Sanchez-Vioque and al. 2004). Nous avons donc mis au point les conditions d'hydrolyses enzymatiques qui permettent d'obtenir une gamme de degré d'hydrolyse compris en 20 et 35%.**

### **III.4.2. L'hydrolyse totale par catalyse acide**

L'hydrolyse totale en catalyse acide, contrairement à l'hydrolyse enzymatique, permet de rompre toutes les liaisons peptidiques des protéines.

Les protéines de pois sont hydrolysées totalement (hydrolyse effectuée en quintuplât) afin de déterminer expérimentalement la concentration moyenne de fonctions amines libres dans la protéine. Le dosage OPA donne une concentration de fonctions amines de  $7,97 \pm 0,54$  mmol/g de protéine. Cette donnée est utilisée pour le calcul du degré d'hydrolyse des hydrolysats obtenus par voie enzymatique.

Le nombre moyen d'acides aminés et le nombre moyen de lysines dans l'isolat de protéines de pois permettent de calculer la concentration en fonctions amines des protéines totalement hydrolysées. Ainsi, 1 g de protéine pure totalement hydrolysée contient 9,57 mmol de  $\text{NH}_2$ . Ce qui représente un biais de 16,5% par rapport à la valeur expérimentale. Cet écart vient très probablement des différentes approximations qui sont faites, en particulier l'utilisation d'une masse molaire moyenne des protéines de pois. En effet, la distribution de la taille des protéines qui constituent notre isolat n'est pas connue avec précision. La teneur des différentes familles de protéine varie d'un lot à l'autre.

### **III.4.3. L'hydrolyse partielle par catalyse enzymatique**

#### **III.4.3.1. Etat de l'art de l'hydrolyse par catalyse enzymatique des protéines végétales**

La modification enzymatique la plus étudiée et la seule développée au stade industriel est l'hydrolyse des liaisons peptidiques de la protéine, par des protéases.

Des hydrolyses en présence d'enzymes ont été étudiées sur différents substrats d'origine végétale. Elles ont été réalisées à l'aide de différentes protéases et exopeptidases. Les plus fréquemment rencontrées dans la littérature sont l'Alcalase, la Flavourzyme, la Chymotrypsine, la Pepsine et la Trypsine.

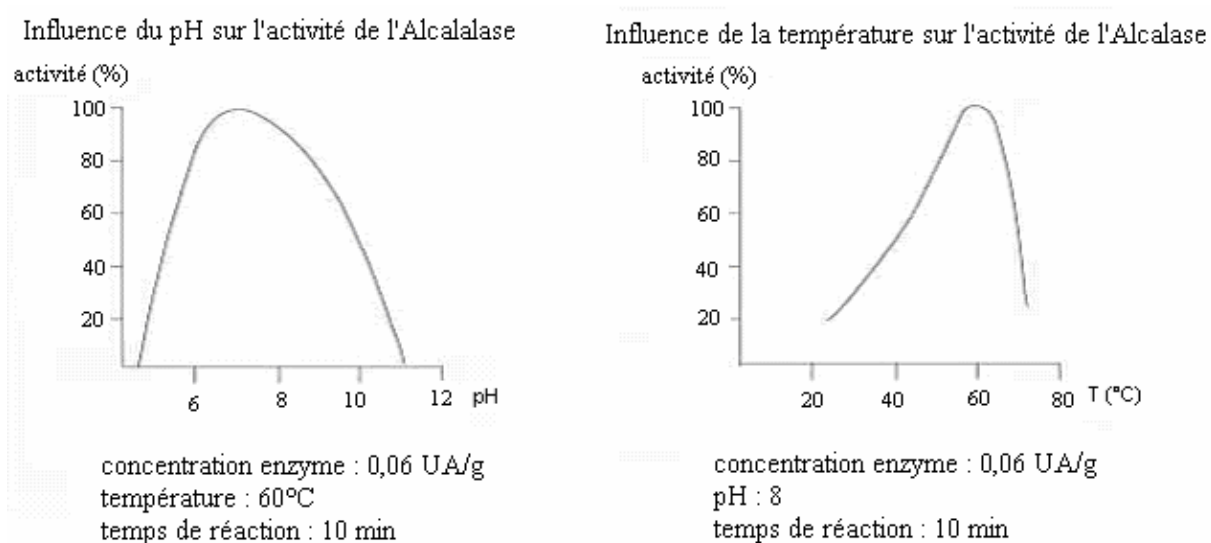
Nous souhaitons établir des conditions opératoires d'hydrolyse, en catalyse enzymatique, permettant d'obtenir des degrés d'hydrolyse de 20 à 35%, ce qui correspondrait à des peptides possédants, en moyenne, 3 à 5 acides aminés. Une première étape consiste à choisir la ou les enzymes permettant d'atteindre, à moindre coût, ces degrés d'hydrolyse avec le substrat, précédemment choisi, et d'établir les conditions expérimentales optimales à mettre en œuvre.

L'hydrolyse enzymatique des protéines de pois, la plus fréquemment rencontrée, est celle réalisée à l'aide de la Trypsine (Karamac and al. 1998; Karamac and al. 2002; Tsoukala and al. 2006; Humiski and Aluko 2007). L'influence de la Tripsine et la Chymotripsine sur les protéines de réserve de légumineuses, a été étudiée (Vaintraub and al. 1976) et, plus particulièrement, sur les protéines de pois (Humiski and Aluko 2007). Le Gall et al. ont étudié l'influence de l'hydrolyse catalysée successivement par la Pepsine et la Tripsine sur des isolats de protéines de pois (Le Gall and al. 2005). Les degrés d'hydrolyse obtenus avec la Tripsine seule n'excèdent pas 14% et 19%, après 2 h et 4 h de réaction, respectivement (Karamac and al. 2002; Humiski and Aluko 2007). Les degrés d'hydrolyse obtenus avec une hydrolyse séquencée de 6 h, à l'aide de la Trypsine et de la Pepsine, atteignent 10 à 25% (Le Gall and al. 2005).

Clemente et al. ont réalisé des hydrolyses individuelles et séquencées de protéine de pois chiche, à l'aide de la Flavourzyme 1000MG et de l'Alcalase 2.4L. Ils obtiennent des degrés d'hydrolyse de 27 et 52%, respectivement, pour les hydrolyses individuelles et séquencées (Clemente and al. 1999). Il semblerait donc que des degrés d'hydrolyse plus importants soient obtenus avec l'Alcalase et la Flavourzyme, bien que le temps d'incubation ne soit pas précisé. La trypsine est une enzyme spécifique qui rompt les liaisons peptidiques du C terminal des

arginines et lysines. Or, les protéines de pois contiennent 15,5% de lysine et d'arginine et donc le degré d'hydrolyse maximal que l'on peut atteindre, à priori, est de 15%. Souhaitant obtenir des degrés d'hydrolyse compris entre 20 et 35%, nous avons donc privilégié l'Alcalase et la Flavourzyme, mieux adaptées pour hydrolyser l'isolat protéique de pois, avec les degrés d'hydrolyse souhaités.

L'Alcalase est une endopeptidase de *Bacillus licheniformis* dont la Subtilisine Carlsberg est le composé enzymatique majoritaire. Il s'agit donc d'un mélange d'enzymes commercial. L'Alcalase utilisée possède une activité spécifique de 2,4 unités Anson (UA) par gramme. Elle est largement utilisée pour générer des hydrolysats de protéine (Adler-Nissen 1986). Une unité Anson est ici définie comme étant la quantité d'enzyme qui, incubée pendant 10 minutes, à 25°C et à pH 7,5 en présence d'hémoglobine dénaturée, libère de ce substrat l'équivalent de 1 µg de tyrosine, déterminée par absorption spectrophotométrique à 280 nm, sur le filtrat non précipitable à l'acide trichloracétique. Les conditions d'activité optimale de l'Alcalase sont obtenues à des températures comprises entre 50 et 60°C et à des pH compris entre 6,5 et 8 (Figure III-4).



**Figure III-4 : Activité de l'Alcalase en fonction du pH et de la température (Sigma-Aldrich 2007)**

La Flavourzyme 500L est un mélange d'exopeptidases et d'endoprotéases composés de cinq composés enzymatiques protéolytiques ou plus (Nielsen and al. 1994) avec une activité de 500 leucine aminopeptidase unit (LAPU) par gramme. Une LAPU est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 mmol de leucine-p-nitroaniline par minute, en utilisant la méthode AF 298/1



(Novo Nordisk). La Flavourzyme est une préparation introduite par Novo Nordisk (Pommer 1995) pour diminuer l'amertume des hydrolysats de protéines qui ont de faibles degrés d'hydrolyse (10% à 20%), ainsi que pour rehausser le goût des hauts degrés d'hydrolyse (50% et plus). Les conditions d'activité optimale de la Flavourzyme sont obtenues pour des températures comprises entre 50 et 60°C et à des pH compris entre 5 et 7,5 (Figure III-5).

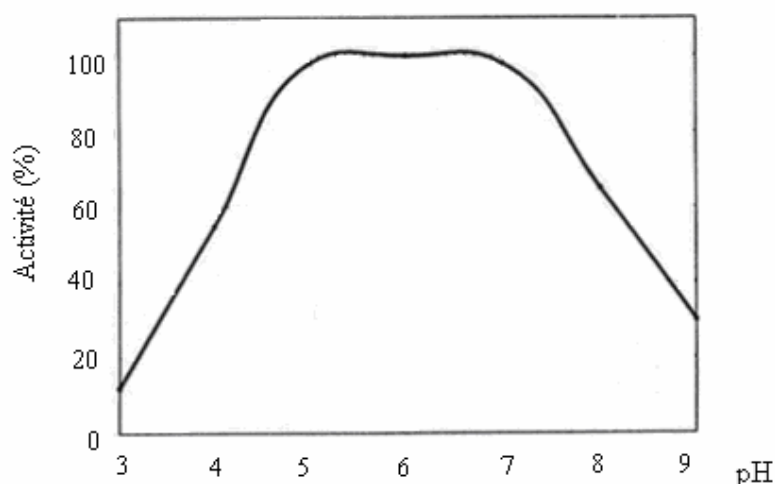


Figure III-5 : Activité de la Flavourzyme en fonction du pH (Pommer 1995)

L'hydrolyse par l'Alcalase et/ou la Flavourzyme a été largement étudiée. Nous nous sommes intéressé aux conditions opératoires appliquées pour hydrolyser différentes protéines végétales, à l'aide de ces deux enzymes, ainsi qu'aux degrés d'hydrolyse obtenus. Les hydrolyses peuvent être effectuées soit à l'aide d'une seule enzyme, soit à l'aide des deux enzymes, de façon séquencée. Dans ce dernier cas, l'Alcalase est introduite seule, puis, dans un second temps, la Flavourzyme est ajoutée au milieu réactionnel. Les différents degrés d'hydrolyse obtenus, en fonction de la nature du substrat et des conditions opératoires (ratio enzyme/substrat, concentration en substrat, durée de réaction) sont rassemblés dans les Tableau III-7, III-8 et III-9. Ces hydrolyses enzymatiques sont effectuées avec une concentration en substrat de 2 à 20% et à une température de 50°C. Les hydrolyses, en présence d'Alcalase, ont lieu généralement à pH 8 et, celles effectuées avec la Flavourzyme, à pH 7. Dans ces conditions, ces enzymes ont une activité optimale.

isolat protéique	substrat (% w/v)	enzyme/substrat (UA/g)	durée (h)	DH max (%)	références
tournesol	10	0,0025	0,25	5,6	(Conde Jose and al. 2005)
	10	0,3	0,75	23,5	
	5-8	0,048	2,5	37	(Ordonez and al. 2008)
	5	0,4	3	31,7	(Villanueva and al. 1999)
pomme de terre	7	0,17	26	7	(Kamnerdpetch and al. 2007)
colza	14,5	0,3	1	NC	(Cumby and al. 2008)
	4	0,056	3	15	(Chabanon and al. 2007)
	4	0,28	3	21	
	5	0,30	1	28	(Vioque and al. 1999)
blé	20	0,029	5	20	(Spellman and al. 2005)
pois chiche	2	0,4	NC	<27	(Clemente and al. 1999)
pois	5	0,14	4	27,5	(Humiski and Aluko 2007)
son de riz	20	0,012	NC	7,5	(Hamada 2000)

NC : non communiqué

**Tableau III-7 : Exemples, dans la littérature, d'hydrolyses de protéines végétales par l'Alcalase**

isolat protéique	substrat (%)	enzyme/substrat (LAPU/g)	durée (h)	DH max (%)	références
pomme de terre	5-8	70	26	23	(Kamnerdpetch and al. 2007)
colza	14,5	50	2	NC	(Cumby and al. 2008)
tournesol	5	100	3	42,2	(Villanueva and al. 1999)
pois chiche	2	100	NC	<27	(Clemente and al. 1999)
pois	5	29	4	54,9	(Humiski and Aluko 2007)
son de riz	20	5	NC	8,8	(Hamada 2000)

NC : non communiqué

**Tableau III-8 : Exemples, dans la littérature, d'hydrolyses de protéines végétales par la Flavourzyme**

isolat protéique	substrat (%)	enzyme/substrat (UA/g) (LAPU/g)	durée (h)	DH max (%)	références
tournesol	5-8	0,024 à 0,048 20 à 25	2,5 2	NC	(Ordenez and al. 2008)
	10	0,3 50	0,75 0,5	NC	(Conde Jose and al. 2005)
	5	0,4 100	1 2	46,3	(Villanueva and al. 1999)
	5	0,3 100	1 2	54,3	(Megias and al. 2007)
colza	14,5	0,3 50	1 2	65	(Cumby and al. 2008)
	5	0,3 50	1 2	60	(Vioque and al. 1999)
soja	16,5	0,073 75	5 20	60	(Kofoed and al. 1998)
pois chiche	2	0,4 100	NC	52	(Clemente and al. 1999)
pomme de terre	7	0,05 50	2 26	45	(Kamnerdpetch and al. 2007)

NC : non communiqué

**Tableau III-9 : Exemples, dans la littérature, d'hydrolyses séquencées de protéines végétales par l'Alcalase et la Flavourzyme**

Les degrés d'hydrolyse obtenus avec un même ratio enzyme/substrat (E/S), d'un isolat protéique à un autre, sont très variables. Par exemple, pour un rapport E/S de 0,17 UA/g, les protéines de pomme de terre sont hydrolysées à 7%, au bout de 26 h, alors que celles issues du colza, pour un ratio E/S inférieur de 0,056 UA/g et un temps d'incubation plus court (3 h), sont hydrolysées à 15%.

Le degré de purification de la protéine substrat influe considérablement sur le degré d'hydrolyse, ce qui explique en partie ces écarts. En effet, certaines protéines, en particulier les protéines de réserve, comme celles contenues dans les graines de légumineuses, contiennent une quantité non négligeable d'inhibiteurs de protéases (Vaintraub and al. 1976).

**Il est donc indispensable de faire l'étude de l'hydrolyse enzymatique sur notre isolat protéique.**

Les degrés d'hydrolyse obtenus avec une seule enzyme sont inférieurs à ceux obtenus avec une hydrolyse séquencée à l'aide de plusieurs enzymes. Pour obtenir un hydrolysats de peptides possédant une faible longueur moyenne (3 à 5 acides aminés), un mélange d'exoprotéases et d'endoprotéases est souvent utilisé car une seule enzyme ne peut fournir un hydrolysats avec un degré d'hydrolyse élevé, en un temps raisonnable (Lahl and Braun 1994).

**Il est donc judicieux d'étudier l'hydrolyse enzymatique de notre isolat en présence de plusieurs enzymes.**

L'hydrolyse doit être effectuée de manière contrôlée pour produire des peptides de tailles recherchées. **L'objectif de la présente étude est donc d'optimiser les paramètres de la réaction d'hydrolyse d'un isolat protéique de pois, en présence de deux protéases, l'Alcalase 2.4L et la Flavourzyme 500L. Pour cela, on étudie l'influence des principaux paramètres de la réaction sur le degré d'hydrolyse, c'est-à-dire sur la longueur moyenne des chaînes peptidiques (LCP) obtenue.** La LCP correspond au nombre moyen d'acides aminés par peptides. Des conditions expérimentales optimales sont définies afin d'obtenir des degrés d'hydrolyse variant de 20 à 35%, ce qui correspond à des LCP de 3 à 5 acides aminés.

**Toutes les hydrolyses mettent en jeu des variables indépendantes : le ratio enzyme/substrat (E/S), le pH, la température du milieu réactionnel (T), le temps de réaction (t), l'agitation, la concentration du substrat (S)...Afin de travailler dans des conditions optimales des deux protéases, nous avons fixé le pH à 7,5 et la température du milieu à 50°C. Nous travaillons avec une concentration en substrat (S) de 10% et une agitation de 500 tr/min. Toutes les hydrolyses ont été réalisées au moins en duplicata.**

### **III.4.3.2. Influence du mode d'agitation**

Nous avons souhaité étudier l'influence de la mise en contact des réactifs sur le degré d'hydrolyse car nous sommes en présence d'un système hétérogène. En effet, l'isolat protéique n'est pas totalement soluble dans les conditions opératoires, soit à une concentration

de l'isolat de 10% dans l'eau. Pour cela, nous avons regardé l'influence du mode d'agitation sur ce dernier. En effet, pour une vitesse d'agitation donnée, une agitation mécanique permettrait une meilleure homogénéisation du milieu qu'une agitation magnétique. De même, une agitation à l'aide du turbotest Raynerie pourrait améliorer la mise en contact des réactifs, en comparaison à l'agitation mécanique.

20 g d'isolat de protéine de pois sont hydrolysés avec l'Alcalase (E/S = 0,2 UA/g) et la Flavourzyme (E/S = 63 LAPU/g). Différents modes d'agitation sont testés : l'agitation magnétique, mécanique et à l'aide du turbotest Raynerie. La vitesse d'agitation utilisée, dans tous les cas, est de 500 tr/min. Le degré d'hydrolyse obtenu, selon chaque mode d'agitation, est mesuré (Tableau III-10). Les trois types d'agitation donnent des degrés d'hydrolyse comparables. **Il ne semble donc pas y avoir d'influence notable du mode de mise en contact des enzymes et du substrat. Nous avons donc choisi de travailler sous agitation magnétique, plus facile à mettre en oeuvre.** Des essais sous ultrasons ont également été réalisés sans amélioration notable du degré d'hydrolyse.

Mode d'agitation	DH (%)
Turbotest	31,9
Agitation magnétique	29,8
Agitation mécanique	28,3

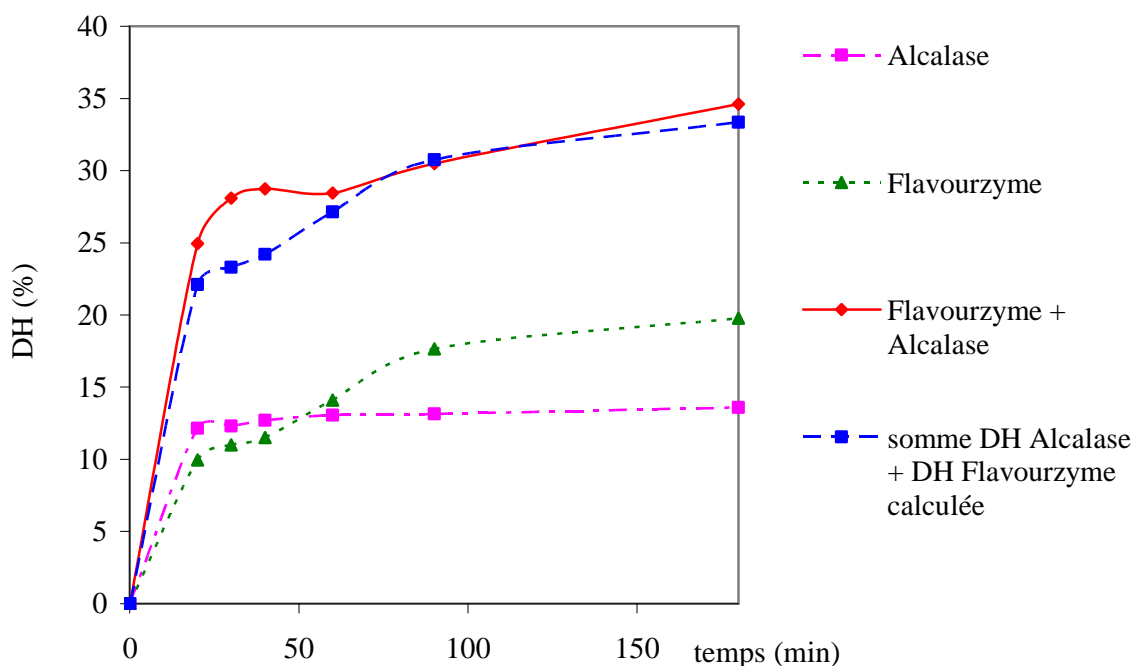
**Tableau III-10: DH en fonction du mode d'agitation en présence d'Alcalase (0,2 UA/g) et de Flavourzyme (63 LAPU/g)**

#### III.4.3.3. Etude de la cinétique de la réaction

L'influence du temps de réaction sur le degré d'hydrolyse, en présence de l'Alcalase seule, de la Flavourzyme seule, puis en présence des deux enzymes, a été étudiée (Figure III-6). On réalise les hydrolyses sur 5 g d'isolat de protéine de pois avec 0,2 UA/g d'Alcalase et 63 LAPU/g de Flavourzyme, sous agitation magnétique, pendant différentes durées de réaction (20, 40, 60, 90 et 180 min). Dans les 3 cas d'étude, le degré d'hydrolyse augmente rapidement au cours des 20 premières minutes. Pour l'Alcalase, le degré d'hydrolyse atteint un plateau autour de 14% dès 40 min, ce qui confirme son inactivation, à 50°C, au-delà de 30

min (Sigma-Aldrich 2007). Avec l'Alcalase, le degré d'hydrolyse atteint 90% de sa valeur maximale dès 20 min. Pour la Flavourzyme, un fort ralentissement de la réaction d'hydrolyse est observé de 40 à 180 min, mais pas son inactivation totale. Le degré d'hydrolyse atteint près de 20% au bout de 3 h de réaction. Avec le mélange des deux enzymes, le profil cinétique est similaire à celui de la Flavourzyme seule, mais le degré d'hydrolyse atteint 35% au bout de 3 h. **Le degré d'hydrolyse obtenu avec le mélange des deux enzymes est bien supérieur à celui obtenu pour une enzyme seule. Par ailleurs, on observe une synergie des deux enzymes lors de la première heure de la réaction.** Dès le début de la réaction, l'Alcalase hydrolyse les protéines. L'accessibilité des sites, par la libération de fonctions amines terminales, est améliorée pour l'activité exopeptidase de la Flavourzyme. Après 1 h de réaction, l'Alcalase est inactivée et la synergie n'est donc plus observée.

L'évolution du degré d'hydrolyse de l'isolat protéique en fonction de la durée de l'hydrolyse est expliqué par plusieurs phénomènes (Marquez Moreno and Fernandez Cuadrado 1993). Au cours de l'hydrolyse, la concentration en liaison peptidique disponible pour l'hydrolyse chute ; les enzymes voient leur activité diminuée et des inhibiteurs de protéases sont produits dans le milieu. Tous ces paramètres vont dans le sens d'un ralentissement de la vitesse de réaction d'hydrolyse au cours du temps.



**Figure III-6: Cinétique de la réaction d'hydrolyse des protéines de pois en présence d'Alcalase (0,2 UA/g) et/ou de Flavourzyme (63 LAPU/g) appliquée à 5 g d'isolat, sous agitation magnétique (500 tr/min), à 50°C et pH 7,5**

#### III.4.3.4. Influence du mode d'introduction des enzymes

Deux protocoles opératoires décrits dans la littérature sont testés. Concernant le premier protocole (protocole séquencé, Tableau III-9) (Clemente and al. 1999; Villanueva and al. 1999; Vioque and al. 1999; Conde Jose and al. 2005; Megias and al. 2007), l'Alcalase est introduite et le milieu est maintenu à pH 8,0, à 50°C, sous agitation magnétique (500 tr/min), pendant une durée variable. Puis, le pH est ajusté à 7,0 et la Flavourzyme est additionnée. Le milieu est alors maintenu à pH 7,0, à 50°C, sous agitation magnétique (500 tr/min), jusqu'à la fin de l'hydrolyse. **Pour le second protocole (protocole simultané) (Aaslyng and al. 1999), les deux enzymes sont introduites simultanément dans le milieu qui est maintenu à 50°C et le pH à 7,5, sous agitation magnétique (500 tr/min), pendant toute la durée de l'hydrolyse.** Les courbes d'activité des enzymes en fonction du pH montrent qu'une activité optimale d'hydrolyse est maintenue pour les deux enzymes à pH 7,5 (Adler-Nissen 1986; Pommer 1995). Les deux méthodes sont comparées sur 1 g d'isolat. La durée d'hydrolyse est fixée, pour le protocole séquencé, à 30 min avec l'Alcalase, et 30 min avec la Flavourzyme et pour le protocole simultané, à 30 min, en présence des deux enzymes. Pour les deux protocoles, les degrés d'hydrolyse sont comparables (Tableau III-11). Les deux enzymes



peuvent donc hydrolyser, simultanément l'isolat protéique, pendant 30 min. **Par la suite, les protéines de pois seront hydrolysées selon le protocole simultané puisqu'il présente une durée de réaction plus courte et une mise en œuvre plus simple.**

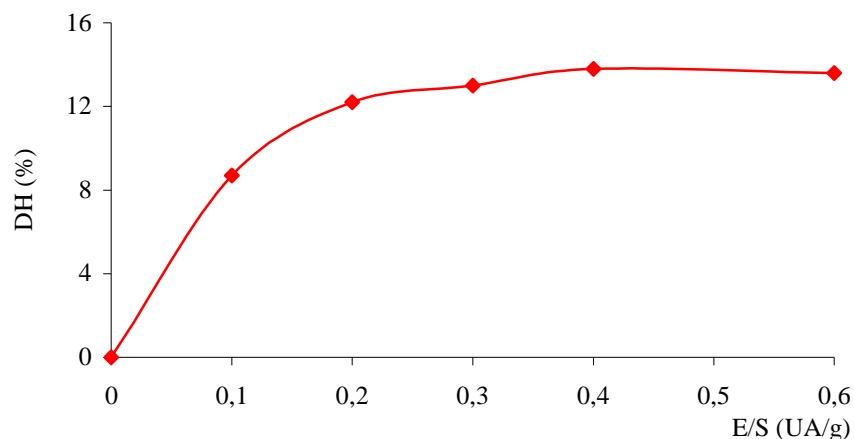
Alcalase E/S (UA/g)	Flavourzyme E/S (LAPU/g)	Protocole	DH (%)
0,2	21	séquenté	28,7
0,2	21	simultané	29,1
0,4	84	séquenté	42,3
0,4	84	simultané	45,5

**Tableau III-11 : Degré d'hydrolyse en fonction du mode d'introduction des enzymes**

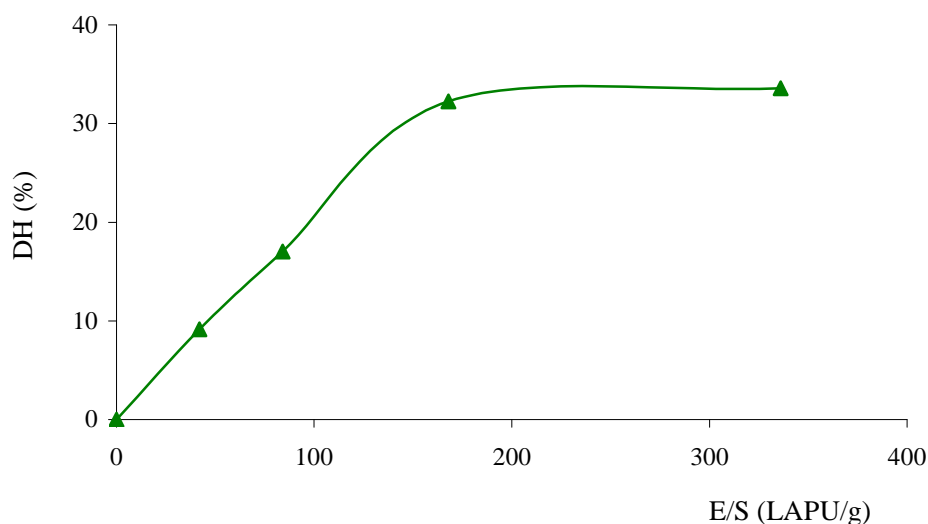
#### **III.4.3.5. Influence du ratio enzyme/substrat (E/S)**

L'influence du ratio E/S sur le degré d'hydrolyse est étudiée. 5 g d'isolat sont hydrolysés avec différentes concentrations en Alcalase (Figure III-7). Le degré d'hydrolyse augmente avec la concentration en enzyme jusqu'à atteindre un palier à 14% : au-delà de 0,4 UA/g, le degré d'hydrolyse n'augmente plus, l'Alcalase n'hydrolyse plus les liaisons peptidiques. En effet, l'Alcalase n'est pas utilisée avec un ratio E/S supérieur à 0,4 UA/g (Tableau III-7). Le changement de conformation lié à l'hydrolyse des protéines en peptides empêcherait l'enzyme de catalyser la réaction, stoppant ainsi l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

De la même manière, on hydrolyse 5 g d'isolat avec de la Flavourzyme (Figure III-8). Le même comportement est observé, avec un palier à partir de 200 LAPU/g et un degré d'hydrolyse de 34%.



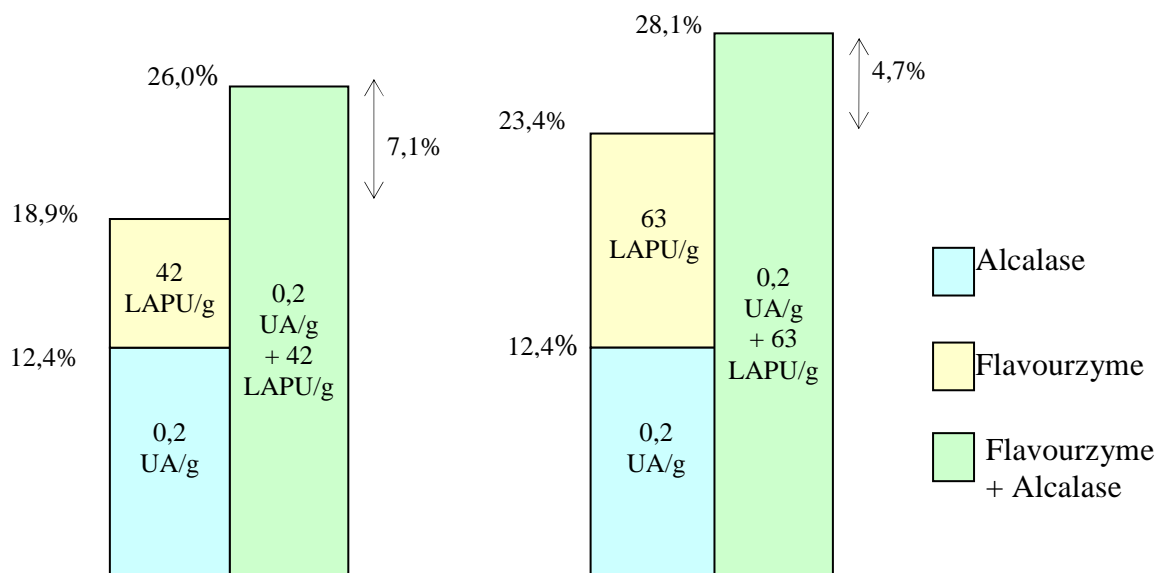
**Figure III-7 : DH en fonction du ration E/S d'Alcalase sur 5 g d'isolat, pH 8,0, à 50°C sous agitation magnétique (500 tr/min), avec une durée de 30 min**



**Figure III-8 : DH en fonction du ration E/S de la Flavourzyme sur 5 g d'isolat, pH 7,0, à 50°C sous agitation magnétique (500 tr/min), avec une durée de 30 min**

Dans un deuxième temps, l'influence du rapport E/S des deux enzymes est étudiée. On fait varier les rapports E/S en Alcalase et en Flavourzyme. Le degré d'hydrolyse obtenu en présence d'Alcalase et de Flavourzyme est supérieur à la somme des degrés d'hydrolyse obtenus en présence de la même quantité d'Alcalase seule et de Flavourzyme seule. Une synergie entre les deux enzymes est observée, pour une durée de réaction de 30 min. Cette synergie dépend du ratio E/S et de la proportion entre les deux enzymes. La Figure III-9 présente deux exemples de synergie pour deux concentrations différentes d'enzymes. Cette

synergie est due à la prédigestion de l'Alcalase qui augmente le nombre d'acides aminés terminaux pour l'activité exoprotéase de la Flavourzyme. La prédigestion avec l'Alcalase réduit le coût de l'hydrolyse car, pour le même degré d'hydrolyse, une quantité inférieure d'enzymes est nécessaire (Villanueva and al. 1999).



**Figure III-9 : Exemple de synergie observée pour des hydrolyses à l'aide de la Flavourzyme et de l'Alcalase, sous agitation magnétique (500 tr/min), avec une durée de 30 min, à 50°C**

Le Tableau III-12 rassemble les résultats des différents essais de la réaction d'hydrolyse de l'isolat protéique de pois réalisés sur 5 g de protéine avec l'Alcalase et la Flavourzyme. On remarque que pour un ratio E/S en Alcalase élevé (0,4 UA/g), l'ajout d'une quantité deux fois plus importante de Flavourzyme ne permet pas l'augmentation du degré d'hydrolyse. En effet, ce dernier est de 31 et 33% pour E/S = 64 et 128 LAPU/g, respectivement. Il en est de même pour un ratio E/S élevé en Flavourzyme (E/S = 128 LAPU), l'ajout d'Alcalase ne permet pas d'atteindre des degrés d'hydrolyse plus élevés : avec un ratio E/S de 0,6 UA/g, on obtient le même degré d'hydrolyse qu'avec un ratio E/S de 0,4 UA/g, soit un degré d'hydrolyse de 33%. L'ajout d'enzymes améliore le degré d'hydrolyse uniquement lorsque leur concentration restent faibles (E/S < 64 LAPU/g et 0,3 UA/g). Ces résultats permettent de définir les quantités minimales en enzymes nécessaires à l'obtention d'un degré d'hydrolyse donné.

Alcalase E/S (UA/g)	Flavourzyme E/S (LAPU/g)	DH (%)
0,2	21	16,8
	42	26,0
	64	28,1
0,3	21	21,3
	42	22,3
	64	30,7
0,4	64	31,3
	84	30,9
	128	33,0
0,6	128	33,2

**Tableau III-12: DH en fonction du ratio E/S de protéases****III.4.3.6. Etude de la répétabilité de l'hydrolyse**

La répétabilité de l'hydrolyse est étudiée sur 5 g d'isolat, dans des conditions définies, et sur 3 essais effectués dans la même journée. De façon comparable, on étudie la répétabilité sur trois jours différents. Les résultats sont donnés dans le Tableau III-13. L'écart type du degré d'hydrolyse des essais effectués, dans les mêmes conditions, à des jours différents est inférieur à 1,8%. Compte tenu de ce faible écart type, l'évaluation du degré d'hydrolyse n'est donc pas nécessaire pour les essais réalisés par la suite, dans des conditions similaires. On pourra donc acyler directement nos hydrolysats, sans mesure du degré d'hydrolyse systématique.

Alcalase E/S (UA/g)	Flavourzyme E/S (LAPU/g)	DH <sub>moyen</sub> sur 1 jour (%)	Ecart type intra jour (%)	DH <sub>moyen</sub> sur 3 jours (%)	Ecart type inter jour (%)
0,2	64	27,20	0,73	27,81	1,70
0,3	42	22,26	0,72	21,45	1,73
0,4	126	36,02	0,88	35,86	1,42

Tableau III-13 : Répétabilité du degré d'hydrolyse intra et inter jour

### III.5. Conclusion générale

De part sa teneur élevée en protéines (25,6% de la matière sèche), son taux important d'acides aminés basiques (11% d'arginine et d'histidine), sa culture ne nécessitant pas l'apport d'engrais azotés et sa disponibilité commerciale, nous avons choisi les protéines de pois comme matière première pour la synthèse des tensioactifs.

L'isolat protéique étudié a alors été caractérisé en vue d'identifier les principaux groupes fonctionnels présents, susceptibles de subir des transformations enzymatiques et chimiques.

Nous avons ensuite étudié et optimisé les paramètres impliqués dans la réaction d'hydrolyse des protéines de pois, en présence d'un mélange de protéases et de peptidases, afin d'obtenir des degrés d'hydrolyse souhaités. Nous avons obtenu des hydrolysats dont les degrés d'hydrolyse sont compris entre 16 et 36% (Tableau III-14). Ces peptides constitueront la tête hydrophile des tensioactifs lipopeptidiques.

Alcalase E/S (UA/g)	Flavourzyme E/S (LAPU/g)	DH (%)	Coût moyen pour hydrolyser 1 g d'isolat protéique (€*10 <sup>2</sup> )
0,10-0,30	21	16-20	11,68
0,20-0,30	42	22-26	17,51
0,20-0,40	63	28-31	23,35
0,40-0,60	84-126	32-36	39,03

**Tableau III-14: Panel de degré d'hydrolyse sur 5 g d'isolat protéique, sous agitation magnétique (500 tr/min), à 50°C, pH 7,5, avec une durée de 30 min**

**Cependant, nous n'avons pas étudié la distribution de la taille de peptides. Nous avons fait le choix de concentrer nos efforts sur la synthèse de mélanges de tensioactifs anioniques puis cationiques, au détriment de la connaissance exacte de la distribution de taille des hydrolysats obtenus.** Des travaux bibliographiques montrent que les outils adaptés à ces études seront principalement de l'électrophorèse (Radha and al. 2007), de la chromatographie par perméation de gel (GP-HPLC) ou par exclusion stérique (Guérard and al. 2001; Spellman and al. 2005), de l'HPLC en phase inverse (Spellman and al. 2005; Ordonez and al. 2008), les chromatographes étant couplés à un détecteur UV. De tels travaux sont en cours, afin de déterminer le profil de taille des peptides précédemment obtenus. Les premiers résultats montrent que les hydrolysats contiennent des peptides de taille très variable, allant de l'acide aminé seul, au peptide de 70 kDa. La donnée de la longueur moyenne des peptides (LCP) ne semble donc pas être une description pertinente des hydrolysats obtenus. Au début de l'hydrolyse, les protéines ne sont pas dénaturées et se présentent sous forme compacte. Les liaisons peptidiques situées au cœur de la protéine ne sont pas accessibles à l'Alcalase, ce qui expliquerait la présence de gros peptides. En parallèle, l'activité exopeptidase de la Flavourzyme implique la présence d'acides aminés seuls dans le mélange. Afin d'obtenir un profil de taille moins large, on pourrait réaliser une étape préliminaire de dénaturation des protéines, par chauffage de ces dernières, en solution aqueuse, avant de les hydrolyser.

Par ailleurs, nous nous sommes limité à des durées de réaction de 30 min, car cette dernière nous a permis d'atteindre des degrés d'hydrolyse de 30% souhaités. Cependant, vu la présence dans le milieu de peptides de masse moléculaire élevée, il pourrait être également

intéressant de pousser l'hydrolyse jusqu'à des degrés d'hydrolyse de 50%. A la vue du profil cinétique de la Flavourzyme (Figure III-6), et des données bibliographiques, ceci pourrait être réalisé en allongeant les durées d'incubation.

**L'étape suivante de notre travail consiste maintenant à greffer une chaîne lipophile sur notre hydrolysats peptidique afin d'obtenir des mélanges de tensioactifs anioniques.**

## BIBLIOGRAPHIE

Aaslyng M.D., Martens M., Poll L., Nielsen P.M., Flyge H. and Larsen L.M. (1998) Chemical and Sensory Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, a Savory Flavoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(2):481.

Aaslyng M.D., Poll L., Nielsen P.M. and Flyge H. (1999) Sensory, chemical, and sensometric studies of hydrolyzed vegetable protein produced by various processes. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*. 209(3-4):227.

Adler-Nissen J. (1986) Enzymatic hydrolysis of food proteins. London and New York, Elsevier applied science publishers.

Arômes (2007) Le pois : source méconnue de protéines. *Arômes Ingrédients Additifs*. 68:54.

Chabanon G., Chevalot I., Framboisier X., Chenu S. and Marc I. (2007) Hydrolysis of rapeseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*. 42:1419.

Clemente A., Vioque J., Sanchez-Vioque R., Pedroche J., Bautista J. and Millan F. (1999) Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 67(3):269.

Conde Jose M., Escobar Maria del Mar Y., Pedroche Jimenez Justo J., Rodriguez Francisco M. and Rodriguez Patino Juan M. (2005) Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20):8038.

Crevieu-Gabriel I. (1999) Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois. *INRA Production Animales*. 12(2):147.

Crévieu I., Guéguen J. and Bérot S. (1996) Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Nahrung*. 40:237.

Cumby N., Zhong Y., Naczki M. and Shahidi F. (2008) Antioxidant and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 109:144.

Gruen L.C., Guthrie E. and Blagrove R.J. (1987) Structure of a major pea seed albumin: implication of a free sulphhydryl group. *Journal of the Science and Food and Agriculture*. 41:167.

Guéguen J. (1990) Relations entre propriétés physicochimiques et propriétés tensioactives des globulines végétales. Nantes, Université de Nantes. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences.

Guéguen J. and Cerletti E. (1994) Proteins of some legumes seeds: soybean, pea, fava bean and lupin. In *New and developing sources of food proteins*. B. J. F. Hudson, Ed. Chapman and Hall: USA, p 145.



Guérard F., Dufossé L., De La Broise D. and Binet A. (2001) Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11:1051.

Hamada J.S. (2000) Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science*. 65(2):305.

Higgins T.J.V., Chandler P.M., Randall P.J., Spencer D., Beach L.R., Blagrove R.J., Kortt A.A. and A.S. I. (1986) Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of sulphur-rich protein in pea seeds. *Journal of Biological Chemistry*. 261:11124.

Humiski L.M. and Aluko R.E. (2007) Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 72(8):605.

INRA (1984) L'alimentation des animaux monogastriques.

Kammerdörp C., Weiss M., Kasper M. and Scheper T. (2007) An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:508.

Karamac M., Amarowicz R. and Kostyra H. (2002) Effect of temperature and enzyme/substrate ratio on the hydrolysis of pea protein isolates by trypsin. *Czech Journal of Food Sciences*. 20(1):1.

Karamac M., Amarowicz R., Kostyra H. and Sijtsma L. (1998) Hydrolysis of pea protein isolate "Pisane" by trypsin. *Nahrung*. 42(3-4):219.

Kofoed L.V., Fischer M., Nielsen P.M. and Pommer K. (1998) Method of producing food flavoring agent. Patent N° US6024990.

Lahl W.J. and Braun S.D. (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology* 48:68.

Lawrence M.C., Izard T., Beuchat M., Blagrove R.J. and Colman P.M. (1994) Structure of phaseolin at 2-center-dot-2 angstrom resolution. Implication for a common vicilin/legumin structure and the genetic-engineering of seed storage proteins. *Journal of Molecular Biology*. 238:748.

Le Gall M., Gueguen J., Seve B. and Quillien L. (2005) Effects of grinding and thermal treatments on hydrolysis susceptibility of pea proteins (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8):3057.

Manley C.H., McCann J.S. and Swaine R.N. (1981) The chemical bases of the taste and flavor enhancing properties of hydrolyzed protein. In *The quality of foods and beverages: chemistry and technology*. G. Charalambous and G. Inglett, Eds. Academic Press: New-York, pp 61-82.

Marquez Moreno M.C.M. and Fernandez Cuadrado V. (1993) Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*. 28(7):481.

McArdle R.N., Lasekan J., Engel R. and Behrens P. (1994) Protein and amino acid content of selected microalgae species. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. 27(3):249.

McDermott E.E. and Pace J. (1960) Comparison of the amino-acid composition of the protein in flour and endosperm from different types of wheat, with particular reference to variation in lysine content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 11:109.

Megias C., Pedroche J., Yust M.M., Giron-Calle J., Alaiz M., Millan F. and Vioque J. (2007) Affinity Purification of Copper-Chelating Peptides from Sunflower Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(16):6509.

Meylan S. (2006) L'accumulation des métaux dans les biofilms d'algues. *Eawag News*. 60:19.

Mikola J. (1983) Proteinase, peptidase, and inhibitors of endogenous proteinases in germinating seeds. In *Seed proteins*. J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughn, Eds. pp 35-52.

Mosse J., Huet J.C. and Baudet J. (1988) The amino acid composition of rice grain as a function of nitrogen content as compared with other cereals: a reappraisal of rice chemical scores. *Journal of Cereal Science*. 8(2):165.

Nagodawithana T.W. (1994) Savory flavors. In *Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients*. A. Gabelman, Ed. John Wiley & Sons: New York, p 135.

Nagy S., Telek L., Hall N.T. and Berry. R.E. (1978) Potential food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26:1016.

Nielsen P.M., Hvass P., Hansen K. and Budolfson G. (1994) *Aspergillus* protease composition for preparing protein hydrolyzates for use in food, cosmetics, and fermentation. Patent N° DK9425580.

Ordonez C., Benitez C. and Gonzalez J.L. (2008) Amino acid production from a sunflower wholemeal protein concentrate. *Bioresource Technology*. 99:4749.

Pommer K. (1995) New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World*. 40(10):745.

Proléa (2008) <http://www.prolea.com/index.php?id=1582>.

Radha C., Kuma P.R. and Prakash V. (2007) Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oisseed flour mixture. *Food Chemistry*. 106:1166.

Reiners R.A., Morgan R.E. and Shroder J.D. (1970) Amino acid composition of the protein in commercial corn starch. *Cereal Chemistry*. 47(2):205.

Sanchez-Vioque R., Bagger C.L., Larre C. and Gueguen J. (2004) Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 271(1):220.

Sigma-Aldrich (2007) [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme Explorer/Analytical\\_Enzymes/Subtilisin.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Analytical_Enzymes/Subtilisin.html).

Sosulski F.W. and Imafidon G.I. (1990) Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(6):1351.

Spellman D., Kenny P., O'Cuinn G. and FitzGerald R.J. (2005) Aggregation Properties of Whey Protein Hydrolysates Generated with *Bacillus licheniformis* Proteinase Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(4):1258.

Subirade M., Guéguen J. and Pézolet M. (1994) Conformational changes upon dissociation of a globular protein from pea: a FGourier transform infrared spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1205:239.

Tsoukala A., Papalamprou E., Makri E., Doxastakis G. and Braudo E.E. (2006) Adsorption at the air-water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 53:203.

Vaintraub I.A., Bassuener R. and Shutov A.D. (1976) The action of trypsin and chymotrypsin on the reserve proteins of some leguminous seeds. *Nahrung*. 20(8-9):763.

Villanueva A., Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Bautista J. and Millan F. (1999) Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y Aceites (Sevilla)*. 50(6):472.

Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J. and Millan F. (1999) Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76(7):819.

Weir G.S.D. (1992) Protein as a source of flavour. In *Biochemistry of food proteins*. B. J. F. Hudson, Ed. Elsevier Applied Science Publishers: London, pp 363-395.

Wenzel M., Gers-Barlag H., Schimpl A. and Rudiger H. (1993) Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*. 374:887.



**CHAPITRE IV :**  
**OBTENTION DE MELANGES**  
**DE TENSIOACTIFS**  
**ANIONIQUES : GREFFAGE**  
**DE LA CHAÎNE LIPOPHILE**

**CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE ..... - 131 -**

**IV.1. INTRODUCTION ..... - 131 -**

**IV.2. LA N-ACYLATION SUIVANT LA REACTION DE SCHOTTEN-BAUMANN..... - 132 -**

IV.2.1. MISE AU POINT DE LA REACTION DE *N*-ACYLATION DE SCHOTTEN-BAUMANN SUR DES  
ACIDES AMINES MODELES ..... - 132 -

IV.2.1.1. Choix des modèles ..... - 132 -

IV.2.1.2. Résultats et discussions..... - 133 -

IV.2.1.2.1. Mise au point des conditions opératoires ..... - 133 -

IV.2.1.2.2. Généralisation de la N-acylation sur les acides aminés modèles ..... - 136 -

IV.2.1.2.3. Les étapes de purification ..... - 138 -

IV.2.1.2.4. Etude de la composition des mélanges finaux par spectrométrie RMN ..... - 140 -

IV.2.1.3. Conclusion ..... - 152 -

IV.2.2. LA *N*-ACYLATION DE L'HYDROLYSAT PROTEIQUE DE POIS..... - 152 -

IV.2.2.1. Introduction..... - 152 -

IV.2.2.2. Résultats et discussion ..... - 153 -

IV.2.2.3. Traitements des mélanges ..... - 154 -

IV.2.2.4. Conclusion ..... - 155 -

**IV.3. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES ..... - 155 -**

IV.3.1. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS OBTENUES PAR *N*-  
ACYLATION DES ACIDES AMINES MODELES..... - 155 -

IV.3.1.1. Tension de surface (TS) et concentration micellaire critique (CMC)..... - 155 -

IV.3.1.2. Les propriétés moussantes ..... - 159 -

IV.3.1.3. Conclusion ..... - 161 -

IV.3.2. MESURES DES PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS DE TENSIOACTIFS  
ANIONIQUES OBTENUS A PARTIR DES PROTEINES DE POIS..... - 162 -

IV.3.2.1. Tension de surface et concentration micellaire critique..... - 162 -

IV.3.2.2. Les propriétés moussantes ..... - 165 -

IV.3.2.3. Les propriétés émulsifiantes ..... - 167 -

IV.3.2.4. Conclusion ..... - 170 -

**IV.4. CONCLUSION GENERALE ..... - 170 -**

**BIBLIOGRAPHIE ..... - 172 -**

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

### IV.1. Introduction

L'objectif est de greffer une chaîne lipophile sur les mélanges de peptides et acides aminés obtenus dans les conditions opératoires de la réaction d'hydrolyse. Les peptides et les acides aminés sont des molécules polyfonctionnelles. Ils possèdent plusieurs groupements réactifs, dont les principaux sont les fonctions amines primaires et acides carboxyliques. Sous forme basique, les fonctions amines ont une réactivité plus élevée vis-à-vis des réactifs acyls. Le greffage de la longue chaîne par une réaction de *N*-acylation semble donc être la méthode de greffage la plus facile à mettre en œuvre. La réaction de Schotten-Baumann est donc choisie. Elle est très utilisée pour la synthèse des acides *N*<sup>α</sup>-acylaminés. Son principe consiste à condenser un acide aminé avec un chlorure d'acide gras en milieu alcalin (pH 10-12) (Figure IV-1).

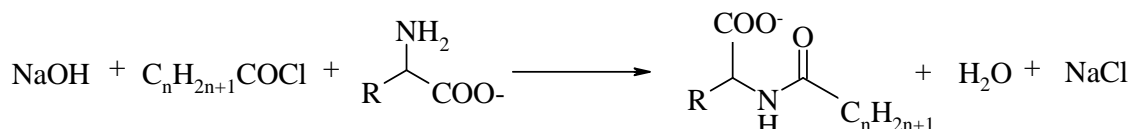
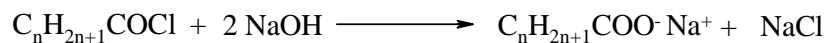


Figure IV-1 : Réaction de *N*-acylation de Schotten-Baumann d'un acide aminé

Toutefois, en raison des conditions opératoires (milieu aqueux alcalin), une fraction du chlorure d'acide s'hydrolyse pour former l'alcanoate de sodium (Figure IV-2). Or, celui-ci s'avère être un cotensioactif anionique. Ce produit issu de la réaction secondaire ne représente pas un déchet à éliminer, mais au contraire, il est conservé et valorisé au sein des mélanges. Il est donc nécessaire de quantifier cette réaction secondaire et de connaître la composition en peptides acylés et en alcanoate de sodium des formulations obtenues, afin de connaître la contribution de chacune de ces molécules amphiphiles. Cette réaction de *N*-acylation s'inscrit

donc dans le concept de la chimie verte et est en parfaite cohérence avec notre démarche scientifique.



**Figure IV-2 : Réaction d'hydrolyse d'un chlorure d'acide en milieu alcalin**

Les mélanges de tensioactifs alors obtenus sont essentiellement composés de molécules amphiphiles anioniques, en raison de la présence des fonctions carboxylates terminales des peptides, mais aussi de la quantité importante d'acides glutamique et aspartique dans la protéine de départ et de la présence de l'alcanoate de sodium.

Par ailleurs, du fait de la complexité des structures des composés issus de l'hydrolyse des protéines, la quantification de la réaction de *N*-acylation et la caractérisation des produits finaux nécessitent, dans un premier temps, l'étude et la mise au point des conditions opératoires de la réaction sur des acides aminés commerciaux, utilisés comme modèles.

## **IV.2. La *N*-acylation suivant la réaction de Schotten-Baumann**

### **IV.2.1. Mise au point de la réaction de *N*-acylation de Schotten-Baumann sur des acides aminés modèles**

#### **IV.2.1.1. Choix des modèles**

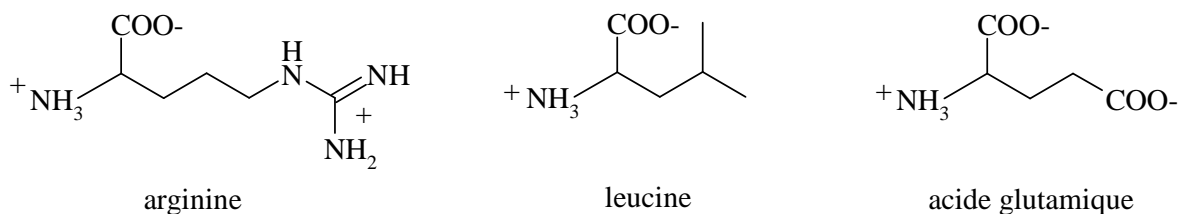
Les modèles doivent être des molécules « simples », disponibles commercialement avec une pureté supérieure à 90% et des prix raisonnables, dont la structure et la réactivité se rapprochent des différents constituants des hydrolysats protéiques. Le principal intérêt de travailler avec des molécules modèles est la simplification de l'analyse et de la caractérisation des mélanges obtenus. En effet, leur utilisation permet la simplification de la composition des mélanges à un système à quelques constituants.



Les hydrolysats étant constitués essentiellement de peptides et d'acides aminés, nous avons choisi comme substrats modèles trois acides aminés avec des chaînes latérales différentes :

- la leucine, avec une chaîne latérale neutre
- l'acide glutamique avec une chaîne latérale acide
- l'arginine, avec une chaîne latérale basique.

Ces trois acides aminés sont des molécules complexes de par leur multifonctionnalité (fonctions amines, carboxylates, guanidines, alkyles). Celle-ci est représentative de celle des peptides et permet d'appréhender les différences de réactivité des acides aminés. Ils présentent des chaînes latérales possédant des groupes fonctionnels différents. La leucine est l'acide aminé neutre majoritaire dans la protéine de pois avec une teneur molaire de 8,44%. Il en est de même pour l'acide glutamique et l'arginine qui sont des acides aminés dicarboxylique et basique de la protéine avec des teneurs molaires de 13,74% et 8,71%, respectivement.



**Figure IV-3 : Structure de l'arginine, la leucine et l'acide glutamique, acides aminés utilisés comme substrats modèles**

De même, afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne lipophile sur la réactivité et sur les propriétés des tensioactifs, nous avons utilisé trois chlorures d'acide à 8, 10 et 12 atomes de carbone.

#### **IV.2.1.2. Résultats et discussions**

##### **IV.2.1.2.1. Mise au point des conditions opératoires**

Afin d'améliorer le taux de conversion de la réaction de *N*-acylation des acides aminés quatre principaux paramètres ont été étudiés sur la *N*-acylation de l'arginine avec le chlorure d'octanoyle :

- la quantité de chlorure d'acide
- la température de réaction
- la durée de réaction
- la vitesse d'agitation

Le taux de conversion de la réaction par rapport aux acides aminés ( $\eta_{AA}$ ) est déterminé par un dosage OPA des fonctions amines libres avant et après acylation suivant l'équation :

$$\eta_{AA} (\%) = \frac{Ni - Nf}{Ni} \times 100 \quad \text{Équation IV-1}$$

Ni : nombre de fonctions amines libres avant acylation (mol/g)

Nf : nombre de fonctions amines libres après acylation (mol/g)

Dans un premier temps, les influences de la durée et de la température de réaction ont été étudiées. Le protocole du premier essai est inspiré de celui décrit par George and al. (George and al. 1998). Le chlorure d'alkyle est donc introduit dans la solution de sels de sodium de l'acide aminé, à 0°C. Le milieu est maintenu sous agitation, à cette température, pendant 2 h. Puis, la température du milieu réactionnel est portée et maintenue à 50°C, pendant 2 h. Pour les autres synthèses, les températures et durées de réaction sont modulées (Tableau IV-1). Les protocoles opératoires suivis pour les essais n°1, 5 et 6 donnent les meilleurs taux de conversion ( $\eta_{AA}$ ). En effet, une première étape à froid (0°C) serait nécessaire pour réduire la cinétique de l'hydrolyse du chlorure d'acide (Kester 1949; George and al. 1998). Cependant, nous constatons que son introduction à température ambiante, puis une élévation de la température à 50°C, pendant 3 h, conduit à des taux de conversion similaires. Nous avons donc choisi de poursuivre nos essais dans ces conditions opératoires :

- ajout à température ambiante du chlorure d'acide dans la solution de sels d'acide aminé de sodium
- élévation de la température à 50°C qui est maintenue pendant toute la durée de la réaction, soit 3 h

CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

essais	t (h)	T (°C)	$\eta_{AA}$ (%)
1	2	0	61
	2	50	
2	4	0	37
3	4	50	24
4	4	0	51
	2	50	
5	3	introduction du chlorure d'acide à $T_{amb}$ puis 50°C	59
6	6	introduction du chlorure d'acide à $T_{amb}$ puis 50°C	60

**Tableau IV-1 : Influence de la température et du temps de réaction sur la *N*-acylation de l'arginine avec un équivalent de chlorure d'octanoyle, sous agitation mécanique (1000 tr/min)**

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de la vitesse d'agitation et de l'ajout d'un excès de chlorure d'acide sur le taux de conversion (Tableau IV-2). Une vitesse d'agitation élevée favorise la formation d'un gel qui limite la mise en contact des réactifs, ce qui explique le plus faible taux de conversion obtenu à 1000 tr/min.

nombre d'équivalents de chlorure d'octanoyle	vitesse d'agitation (tr/min)	$\eta_{AA}$ (%)
1	1000	61
1	500	67
1,5	500	77

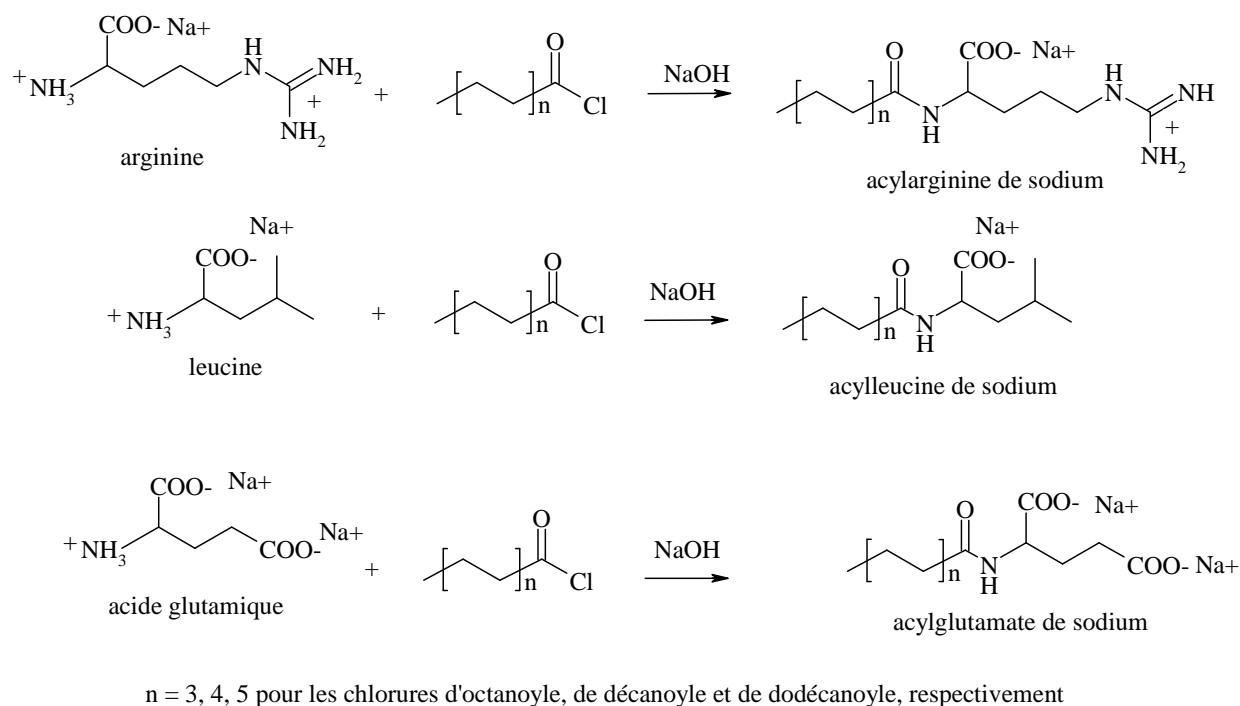
**Tableau IV-2 : Influence de la vitesse d'agitation et de l'ajout d'un excès de chlorure d'octanoyle lors de la réaction de *N*-acylation de l'arginine sous les conditions opératoires décrites précédemment**

Le meilleur taux de conversion est obtenu en présence d'un excès de chlorure d'acide (1,5 éq.). Cependant, l'utilisation d'un excès de chlorure d'acide entraîne la formation d'une plus grande proportion d'alcanoate de sodium dans le milieu. Cependant, c'est une molécule

amphiphile possédant des propriétés tensioactives. Sa présence devrait donc être bénéfique aux propriétés du mélange. Nous avons donc choisi de ne pas l'éliminer par la suite.

#### IV.2.1.2.2. Généralisation de la *N*-acylation sur les acides aminés modèles

**Dans ces conditions opératoires** (ajout dans la solution de sel de sodium de l'acide aminé de 1,5 éq. de chlorure d'acide à température ambiante, puis élévation de la température du milieu réactionnel à 50°C ; maintien du milieu réactionnel à 50°C et sous agitation mécanique à 500 tr/min, pendant 3 h), **nous avons réalisé la réaction de *N*-acylation en présence des trois acides aminés modèles et de trois réactifs lipophiles possédant une chaîne alkyle de 8, 10 et 12 atomes de carbone.** Les sels d'acides *N*<sup>α</sup>-acylaminés correspondant sont obtenus (Figure IV-4).



**Figure IV-4 : Réaction de la *N*-acylation des acides aminés utilisés comme substrats modèles**

Le taux d'acylation ( $\eta_{AA}$ ) est déterminé, comme précédemment, pour les réactions effectuées à partir de la leucine, l'arginine et l'acide glutamique et en présence des chlorures

d'octanoyle, de décanoyle et de dodécanoyle (Tableau IV-3). Celle-ci s'effectue uniquement sur la fonction  $\alpha$  aminé des acides aminés. En effet, l'arginine est une base extrêmement forte dans laquelle le groupement guanidine reste protonné dans les conditions de la *N*-acylation (Geiger and Köning 1981).

chaîne acyle	acylarginine	acylleucine	acide acylglutamique
C8	77	88	75
C10	84	87	53
C12	90	87	64

**Tableau IV-3 : Taux de conversion de la réaction de *N*-acylation des acides aminés modèles ( $\eta_{AA}$ )**

Des taux de conversion élevés sont obtenus avec la leucine ( $\eta_{AA} = 87-88\%$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Xia and al. : les acides aminés neutres sont aisément convertis en acides *N<sup>α</sup>*-acylaminés (Xia and al. 1998). La longueur de la chaîne hydrophobe du chlorure d'acide ne semble pas avoir d'influence sur le taux de conversion. Par contre, dans le cas de la conversion de l'arginine, les taux de conversion augmentent de 77 à 90% avec la longueur de la chaîne lipophile. Les taux de conversion les plus faibles sont obtenus avec l'acide glutamique ( $\eta_{AA} = 53$  à 75%). Ces derniers restent toutefois plus élevés que ceux décrits dans la littérature pour des *N*-acylations effectuées dans l'eau (Takehara and al. 1972). Ces plus bas rendements de la réaction de Schotten-Baumann avec cet acide aminé sont attribués à la production d'anhydride d'acide comme sous produit (Jungermann and al. 1956). Depuis, de nombreux protocoles ont été décrits, mais aucun d'entre eux ne permet de produire commercialement, de façon satisfaisante, le *N<sup>α</sup>*-acylglutamate (Weiss 1959; Paquet 1979). Takehara and al. ont trouvé une méthode innovante en utilisant un mélange eau-solvant organique soluble (acétone, éthanol ou dioxane) pour la *N*-acylation de Schotten-Baumann (Takehara and al. 1974). Le ratio eau/solvant organique qui donne un taux de conversion optimal, qui peut atteindre 94%, dépend de la longueur de la chaîne du chlorure d'acide gras. Cette réaction de Schotten-Baumann modifiée peut être également appliquée à l'acylation des acides aminés neutres pour améliorer le rendement de la réaction. **Cependant, même si la réaction dans un mélange binaire acétone-eau permet l'obtention de taux de conversion**

plus élevés, nous avons choisi de travailler dans l'eau, ceci afin de proposer un procédé respectant l'un des douze principes de la chimie verte : la proscription ou la réduction de l'utilisation de solvant organique. De plus l'hydrolysate de protéine de pois contient seulement 25% d'acides aminés acides contre 75% d'acides aminés neutres et basiques, dont les taux d'acylation sont très satisfaisants dans l'eau.

#### IV.2.1.2.3. Les étapes de purification

En vue d'évaluer les propriétés tensioactives des mélanges, les milieux réactionnels sont traités en fin de réaction afin d'éliminer les molécules ne possédant pas de caractère amphiphile, c'est-à-dire les acides aminés qui n'ont pas réagi et le chlorure de sodium. Un premier traitement consiste à reprendre les produits bruts secs (sous forme acide) à l'éthanol à reflux et à filtrer le mélange. Cette étape permet d'éliminer le chlorure de sodium, insoluble dans l'éthanol, formé au cours de la réaction. Grâce à la détermination de la teneur en matière minérale et de la masse sèche des différentes fractions non solubles dans l'éthanol, les masses des fractions organiques et inorganiques des précipités ont été calculées (Tableau IV-4). Une fraction de chlorure de sodium (11 à 33%), soluble dans l'éthanol technique, n'a pas été éliminée. Il est possible d'extraire une plus grande quantité de sel inorganique en utilisant de l'éthanol anhydre. Les fractions insolubles dans l'éthanol issues des réactions de *N*-acylation avec l'arginine contiennent une fraction de matière organique. La spectrométrie infrarouge de ces fractions révèle qu'il s'agit essentiellement d'arginine (Figure IV-5). En effet, contrairement à la leucine et à l'acide glutamique, l'arginine est faiblement soluble dans l'éthanol.

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

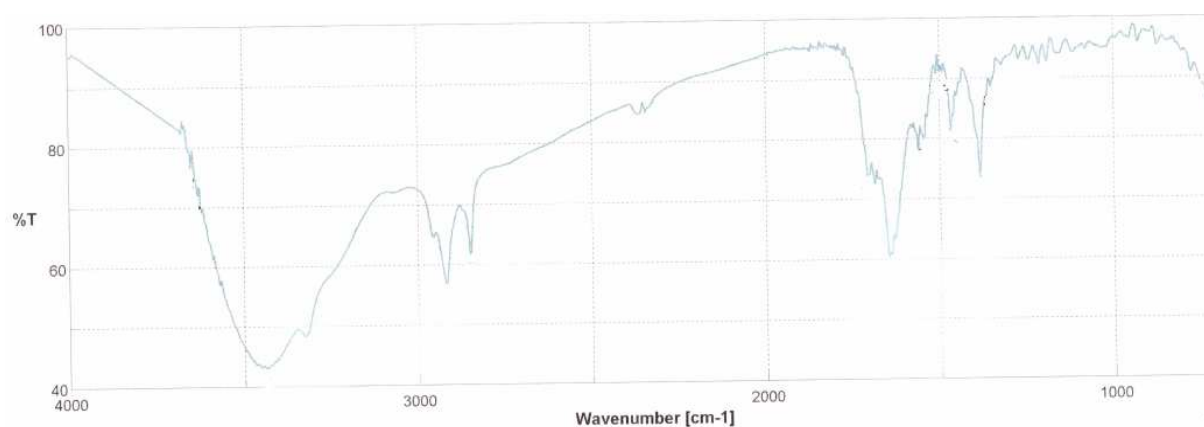
	acylarginine			acylleucine			acide acylglutamique		
chaîne acyle	M <sub>IS</sub> (g)	M <sub>ISt</sub> (g)	M <sub>OI</sub> (g)	M <sub>IS</sub> (g)	M <sub>ISt</sub> (g)	M <sub>OI</sub> (g)	M <sub>IS</sub> (g)	M <sub>ISt</sub> (g)	M <sub>OI</sub> (g)
C8	3,32	3,98	2,02	3,55	3,98	0,06	4,90	5,97	0,01
C10	2,90	3,98	2,99	2,95	3,98	0,01	5,38	5,97	0,02
C12	2,67	3,98	2,38	3,30	3,98	0,00	5,97	5,97	0,00

M<sub>IS</sub> : masse de matière minérale (NaCl) contenue dans la fraction insoluble dans l'éthanol

M<sub>ISt</sub> : masse théorique de NaCl formé au cours de la réaction de *N*-acylation

M<sub>OI</sub> : masse de matière organique insoluble dans l'éthanol

**Tableau IV-4 : Composition en matières minérales et organiques des fractions insolubles dans l'éthanol**



$\nu$ et $\delta$ (cm <sup>-1</sup> )	fonction caractéristique
2918 ; 2850 ; 1468	CH <sub>2</sub>
2954 ; 1385	CH <sub>3</sub>
1706	COOH (acide)
1685	COOH (arginine)
1647	NH <sub>2</sub>

**Figure IV-5 : Spectre IR de la fraction insoluble dans l'éthanol de la synthèse du *N*<sup>α</sup>-dodécanoylarginine**

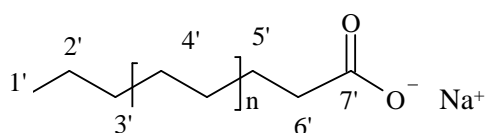
La deuxième étape consiste à faire passer le mélange d'acide *N*<sup>α</sup>-acylaminé/acide carboxylique gras sous forme de sel de sodium. Lors de cette étape, après addition d'une

solution d'hydroxyde de sodium alcoolique, le mélange est précipité dans l'acétone. Les acides aminés qui n'ont pas réagi avec le chlorure d'acide gras sont éliminés (voir paragraphe suivant). En effet, les sels de  $N^{\alpha}$ -acylaminés de sodium et les sels d'alcanoates de sodium ne sont pas solubles dans l'acétone, contrairement aux acides aminés. Les compositions des mélanges finaux sont ensuite étudiées.

#### IV.2.1.2.4. Etude de la composition des mélanges finaux par spectrométrie RMN

Les compositions des formulations finales, en sels d'acide  $N^{\alpha}$ -acylaminé de sodium, en alcanoate de sodium et en acides aminés résiduels, sont déterminées grâce à une étude en spectroscopie RMN.

L'étude préliminaire des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  (zgpr) et  $^{13}\text{C}$  (zgig), complétée des études 2D (COSY, HSQC...) a conduit à l'attribution des signaux. Un exemple de spectres RMN 1D et 2D est donné en annexe (Figure A-1 à A-5) pour le mélange à base de  $N^{\alpha}$ -octanoylglutamate de sodium. Les déplacements chimiques des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans les Tableaux IV-5, IV-6 et IV-7. Pour une meilleure lecture des familles de produits, nous avons choisi de numéroter les atomes de carbone et d'hydrogène en commençant par le groupe méthyle. La nomenclature des sels de  $N^{\alpha}$ -acylaminés de sodium et des sels d'alcanoates de sodium est représentée Figures IV-6 à IV-13.

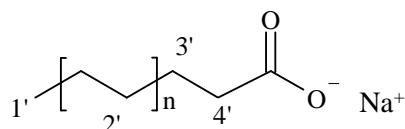


$n = 1, 2, 3$  pour les chaînes contenant 8, 10, 12 atomes de carbone, respectivement

**Figure IV-6 : Représentation et nomenclature des sels d'alcanoates de sodium pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$**



CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

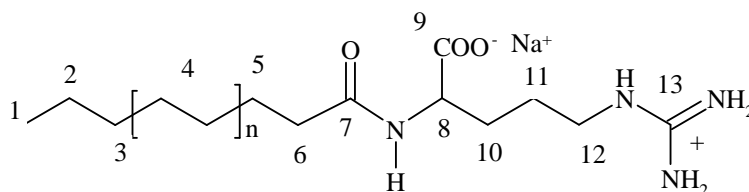


$n = 2, 3, 4$  pour les chaînes contenant 8, 10, 12 atomes de carbone, respectivement

**Figure IV-7 : Représentation et nomenclature des sels d'alcanoates de sodium pour les spectres RMN  $^1\text{H}$**

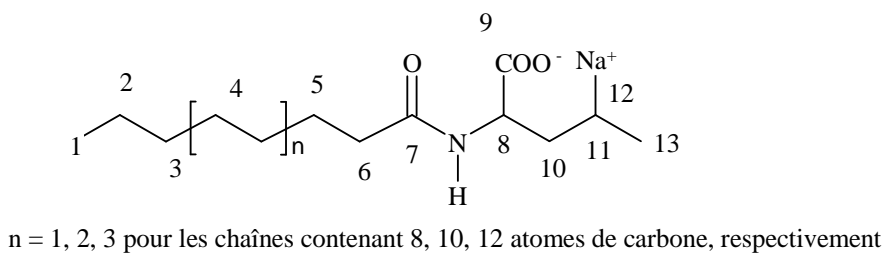
chaîne alkyle	$\delta_{\text{C}}$ (75,5 MHz ; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (300,1 MHz ; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )
C8	13,44 (1'), 22,03 (2'), 31,08 (3'), 28,74 et 28,29 (4'), 25,90 (5'), 37,61 (6'), 184,23 (7')	0,69 (3 H, t, 1'), 1,00 à 1,20 (8 H, s, 2'), 1,31 à 1,50 (2 H, m, 3'), 1,97 à 2,02 (2 H, t, 4')
C10	13,70 (1'), 22,47 (2'), 31,78 (3'), 29,22 à 29,49 (4'), 26,22 (5'), 37,84 (6'), 183,68 (7')	0,70 (3 H, t, 1'), 1,00 à 1,25 (12 H, s, 2'), 1,43 à 1,42 (2 H, m, 3'), 1,96 à 2,01 (2 H, t, 4')
C12	13,80 (1'), 22,62 (2'), 31,97 (3'), 29,45 à 29,85 (4'), 26,38 (5'), 37,95 (6'), 183,50 (7')	0,69 (3 H, t, 1'), 0,95 à 1,25 (16 H, s, 2'), 1,22 à 1,50 (2 H, m, 3'), 1,95 à 2,00 (2 H, t, 4')

**Tableau IV-5 : Attribution des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  des sels d'alcanoates de sodium**

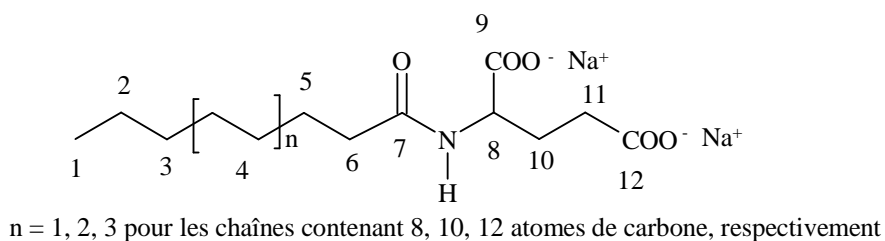


$n = 1, 2, 3$  pour les chaînes contenant 8, 10, 12 atomes de carbone, respectivement

**Figure IV-8 : Représentation et nomenclature des sels de  $N^{\alpha}$ -acylarginines de sodium pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$**



**Figure IV-9: Représentation et nomenclature des sels de  $N^{\alpha}$ -acylleucines de sodium pour la RMN  $^{13}\text{C}$**

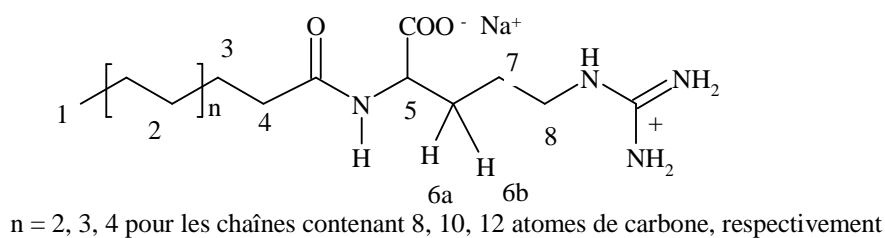


**Figure IV-10 : Représentation et nomenclature des sels de  $N^{\alpha}$ -acylglutamates de sodium pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$**

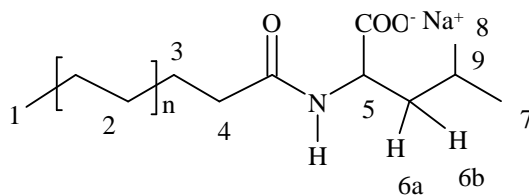
**CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE**

chaîne acyle	acylarginine	acylleucine	acide acylglutamique
C8	13,53 (1), 22,34 (2), 24,24 ou 24,36 ou 24,89 (11), 25,63 (5), 28,86 et 28,78 (4), 31,31 (10), 31,52 (3), 35,85 (6), 40,76 (12), 54,65 (8), 156,72 (13), 175,58 (7), 178,79 (9)	13,47 (1), 20,52 (12), 22,05 ou 22,66 (13), 22,05 ou 22,66 (2), 24,62 (11), 25,51 (5), 28,31 et 28,72 (4), 31,19 (3), 35,78 (6), 40,65 (10), 53,53 (8), 176,33 (7), 180,36 (9)	13,38 (1), 21,93 (2), 25,29 (5), 28,04 (10), 28,18 à 28,51 (4), 30,92 (3), 33,97 à 34,13 (11), 35,74 (6), 55,10 à 55,67 (8), 176,99 (7), 182,15 à 182,63 (9 et 12)
C10	13,73 (1), 22,60 (2), 23,22 (11), 25,91 (5), 29,34 à 29,64 (4), 31,5 (10), 31,94 (3), 36,02 (6), 40,9 (12), 54,63 (8), 156,83 (13), 175,35 (7), 178,95 (9)	13,69 (1), 20,66 (12), 22,57 ou 22,66 (13), 22,58 ou 23,10 (2), 24,86 (11), 26,09 (5), 28,91 à 29,70 (4), 31,92 (3), 36,10 (6), 40,58 (10), 53,37 (8), 175,55 (7), 180,40 (9)	13,68 (1), 22,39 (2), 25,49 (5), 28,56 (10), 28,67 à 29,23 (4), 31,46 (3), 34,41 à 34,43 (11), 36,09 (6), 55,41 à 56,19 (8), 176,79 (7), 181,50 à 183,05 (9 et 12)
C12	13,79 (1), 22,66 (2), 25,08 (11), 26,49 (5), 29,08 à 30,05 (4), 30,05 (10), 32,06 (3), 35,90 (6), 40,90 (12), 55,41 et 56,19 (8), 156,95 (13), 175,29 et 175,26 (7), 179,07 (9)	13,71 (1), 20,68 (12), 22,60 ou 23,15 (13), 22,60 ou 23,15 (2), 24,92 (11), 26,16 (5), 29,01 à 30,01 (4), 32,01 (3), 36,16 (6), 40,58 (10), 53,36 (8), 175,49 (7), 180,41 (9)	13,64 (1), 22,27 (2), 25,50 (5), 28,62 (10), 28,18 à 28,51 (4), 30,92 (3), 33,97 à 34,13 (11), 35,74 (6), 55,10 à 55,67 (8), 176,99 (7), 182,30 à 183,08 (9 et 12)

**Tableau IV-6 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>13</sup>C des sels de N<sup>α</sup>-acylaminés de sodium (D<sub>2</sub>O, Me<sub>4</sub>Si)**

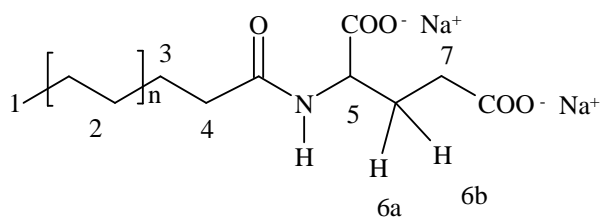


**Figure IV-11 : Représentation et nomenclature des sels de N<sup>α</sup>-acylarginines de sodium pour les spectres RMN <sup>1</sup>H**



$n = 2, 3, 4$  pour les chaînes contenant 8, 10, 12 atomes de carbone, respectivement

**Figure IV-12: Représentation et nomenclature des sels de  $N^\alpha$ -acylleucines de sodium pour les spectres RMN  $^1\text{H}$ .**



$n = 2, 3, 4$  pour les chaînes contenant 8, 10, 12 atomes de carbone, respectivement

**Figure IV-13 Représentation et nomenclature des sels de  $N^\alpha$ -acylglutamates de sodium pour les spectres RMN  $^1\text{H}$**

CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES :  
GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

chaîne acyle	acylarginine	acylleucine	acide acylglutamique
C8	0,66 (3 H, t, 1), 1,08 (8 H, m l, 2), 1,39 (2 H, m, 3), 1,43 à 1,71 (2 H, m l, 6a, 6b, 7), 2,09 (2 H, m, 4), 3,01 (2 H, dd, 8), 3,95 (1 H, dd, 5)	0,68 (3 H, t, 1), 0,69 à 0,71 (3 H, d, 8), 0,72 à 0,75 (3 H, d, 7), 1,08 (8 H, m, 2), 1,20 à 1,50 (3 H, m, 6a, 6b et 9), 1,32 (2 H, m, 3), 2,09 (2 H, m, 4), 3,72 à 4,20 (1 H, 5, dd)	0,68 (3 H, t, 1), 1,11 (8 H, m l, 2), 1,39 (2 H, m, 3), 1,55 à 1,95 (2 H, m, 6a et 6b), 2,01 à 2,39 (2 H, m, 4), 2,01 à 2,39 (2 H, m, 7), 3,69 à 4,18 (1 H, dd, 5)
C10	0,65 (3 H, t, 1), 1,07 (12 H, m l, 2), 1,36 (2 H, m, 3), 1,36 à 1,62 (2 H, m l, 6a, 6b, 7), 2,11 (2 H, m, 4), 3,06 (2 H, dd, 8), 3,96 (1 H, dd, 5)	0,65 ou 0,73 (3 H, t, 1), 0,65 ou 0,73 (3 H, d, 8), 0,76 à 0,78 (3 H, d, 7), 1,09 (12 H, m, 2), 1,36 (2 H, m, 3), 1,43 (2 H, m, 6a et 6b), 2,08 (2 H, m, 4), 4,30 à 3,43 (1 H, 5, dd)	0,67 (3 H, t, 1), 1,11 (12 H, m l, 2), 1,33 (2 H, m, 3), 1,49 à 1,86 (2 H, m, 6a et 6b), 1,92 à 2,20 (2 H, m, 4), 1,92 à 2,20 (2 H, m, 7), 3,86 à 3,91 (1 H, dd, 5)
C12	0,69 (3 H, t, 1), 1,11 (16 H, m l, 2), 1,42 (2 H, m, 3), 1,3 à 1,70 (2 H, m l, 6a, 6b, 7), 2,12 (2 H, m, 4), 3,03 (2 H, dd, 8), 3,95 (1 H, dd, 5)	0,67 à 0,78 (3 H, m, 1), 0,67 à 0,78 (3 H, m, 8), 0,76 à 0,78 (3 H, d, 7), 1,09 (16 H, m, 2), 1,19 à 1,54 (2 H, m, 3), 1,19 à 1,54 (2 H, m, 6a et 6b), 2,13 (2 H, m, 4), 3,43 à 4,30 (1 H, 5, dd)	0,93 (3 H, t, 1), 1,35 (16 H, m l, 2), 1,59 (2 H, m, 3), 1,79 à 2,08 (2 H, m, 6a et 6b), 2,15 à 2,48 (2 H, m, 4), 2,15 à 2,48 (2 H, m, 7), 3,68 à 4,39 (1 H, dd, 5)

**Tableau IV-7 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>1</sup>H des sels de N<sup>α</sup>-acylaminés de sodium (D<sub>2</sub>O, Me<sub>4</sub>Si)**

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont similaires pour chaque série de sels de N<sup>α</sup>-acylaminés de sodium. **Dans ce travail, nous n'avons pas cherché à attribuer la totalité des signaux de la chaîne lipophile, car il nous a semblé plus intéressant d'étudier la réponse des noyaux autour de la liaison amide.**

Les spectres RMN du proton (Figure IV-14) font apparaître quatre multiplés différents dans la zone de 3,8-4,4 ppm (Figure IV-15) alors qu'un signal unique est attendu. De plus, une expérience dept 135 montre la présence d'une multiplicité de carbones asymétriques (C 5) de nature différente (Figure IV-16).

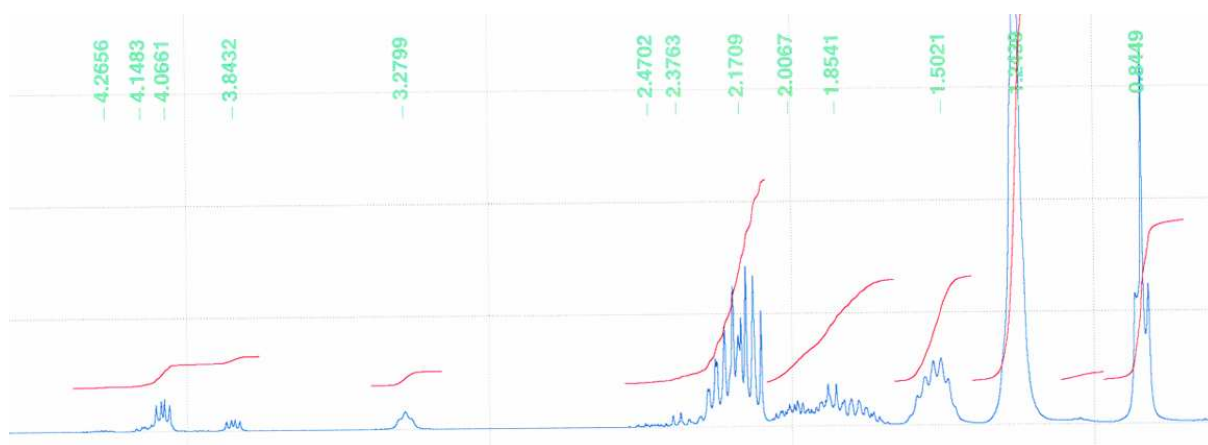


Figure IV-14 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange à base de sels de  $N^a$ -dodécanoylglutamate de sodium

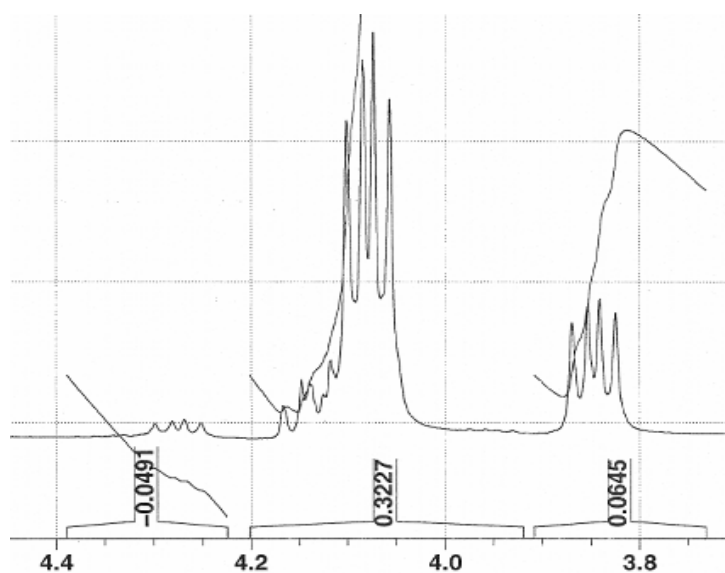


Figure IV-15 : Expansion du spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange à base de sels de  $N^a$ -dodécanoylglutamate de sodium de la zone 3,8-4,4 ppm

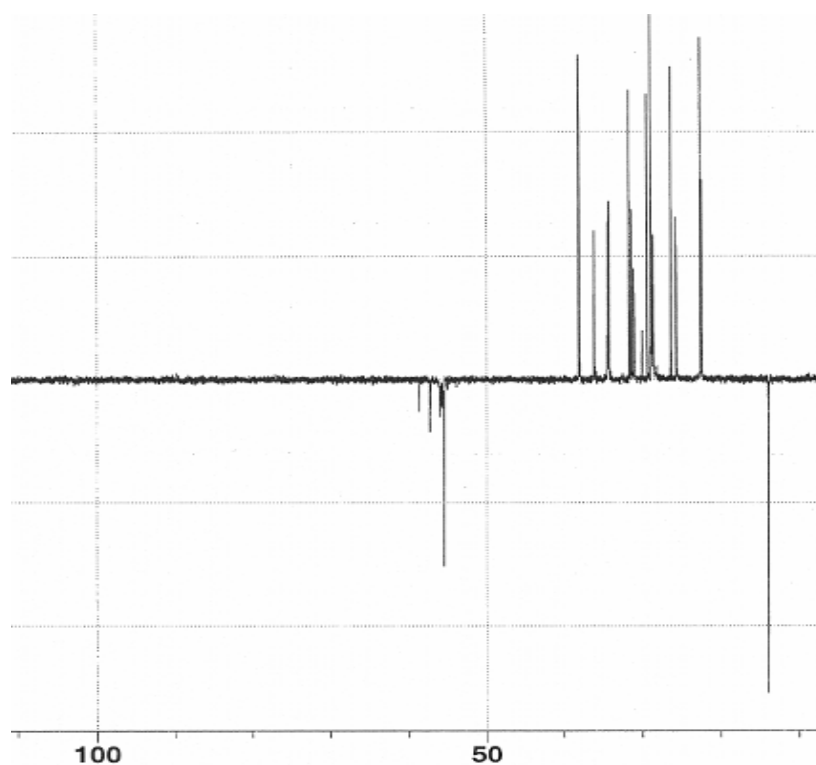
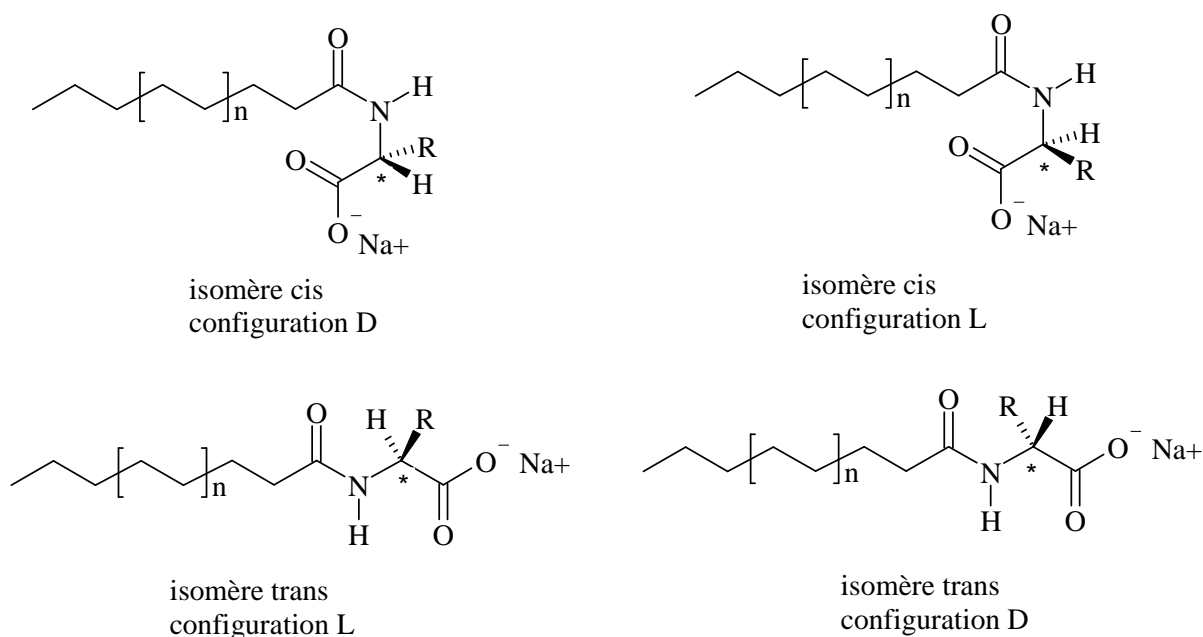


Figure IV-16 : Spectre RMN de la dept 135 du mélange à base de sels de  $N^{\alpha}$ -dodécanoylglutamate de sodium

Cette multiplicité s'expliquerait par l'existence possible de deux conformations cis/trans de la liaison amide (Oshimura and al. 2007) et de deux configurations L et D. Un mélange de quatre molécules de conformation et de configuration différentes est obtenu (Figure IV-17). En effet, pendant l'acylation, l'hydrogène fortement acide du carbone asymétrique est probablement arraché. En raison de cette mobilité relative, une racémisation partielle du produit a lieu. Un mélange d'isomères est obtenu avec une majorité de la forme L de départ. Or, ces isomères ont des propriétés différentes (Ellenbogen 1956). Il serait donc intéressant d'étudier l'influence des conditions opératoires de la *N*-acylation sur la proportion des différents isomères et conformères, afin de privilégier la formation de celui qui possède les meilleures propriétés physiques (solubilité, adsorption) et biologiques visées. L'étude de l'influence de la proportion des différents composés L/D et cis/trans sur les propriétés du mélange serait donc également particulièrement intéressante. En effet, celle-ci donne un intérêt à l'étude structurale des produits de la *N*-acylation des acides aminés et des peptides. Il résulte de la *N*-acylation d'un seul acide aminé un mélange de produits différents de par leur nature et leur conformation et configuration dont la caractérisation est complexe.



n = 1 pour les acides *N*-octanoylaminés  
n = 2 pour les acides *N*-décanoylaminés  
n = 3 pour les acides *N*-dodécanoylaminés

R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C} \begin{smallmatrix} \text{NH}_2 \\ + \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$  pour les *N*-acylarginines de sodium

R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^- \text{Na}^+$  pour les *N*-acylglutamates de sodium

R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$  pour les *N*-acylleucines de sodium

**Figure IV-17 : Isomères de conformations et de configurations des acides acylaminés obtenus**

Les valeurs d'intégration des spectres RMN  $^1\text{H}$  sont déterminées pour permettre le dosage de la teneur en sel de *N*<sup>α</sup>-acylaminé de sodium et en sel d'alcanoate de sodium. Pour les mélanges constitués des trois sels de *N*<sup>α</sup>-acylleucines de sodium et des sels de *N*<sup>α</sup>-octanoylarginine et de *N*<sup>α</sup>-décanoylarginine de sodium, les intégrales choisies correspondent au CH<sub>2</sub> en alpha de la fonction amide (H 4) (intégrale I<sub>1</sub>) et de la fonction carboxylique (H 4') (intégrale I<sub>2</sub>) pour les sels de *N*<sup>α</sup>-acylaminés de sodium et les alcanoates de sodium, respectivement. Pour les formulations à base de sel de *N*<sup>α</sup>-dodécanoylarginine de sodium et des trois sels de *N*<sup>α</sup>-acylglutamates de sodium, les intégrales choisies correspondent au groupe méthyl terminal de la chaîne hydrophobe des tensioactifs (H 1) (intégrales I<sub>1</sub> + I<sub>2</sub>) et du proton



du carbone asymétrique des sels de  $N^{\alpha}$ -acylaminés de sodium (H 5) (intégrale  $I_1$ ) (Figure IV-18). Le dosage des mélanges permet le calcul des rendements  $R_P$  et  $R_S$  à l'aide des formules suivantes :

$$R_P = \frac{I_1}{I_1 + I_2} \times 100 \quad \text{Équation IV-2}$$

$$R_S = \frac{I_2}{I_1 + I_2} \times 100 \quad \text{Équation IV-3}$$

$I_1$  : valeur de l'intégrale correspondant à un proton d'un sel de  $N^{\alpha}$ -acylaminés de sodium

$I_2$  : valeur de l'intégrale correspondant à un proton d'un alcanolate de sodium

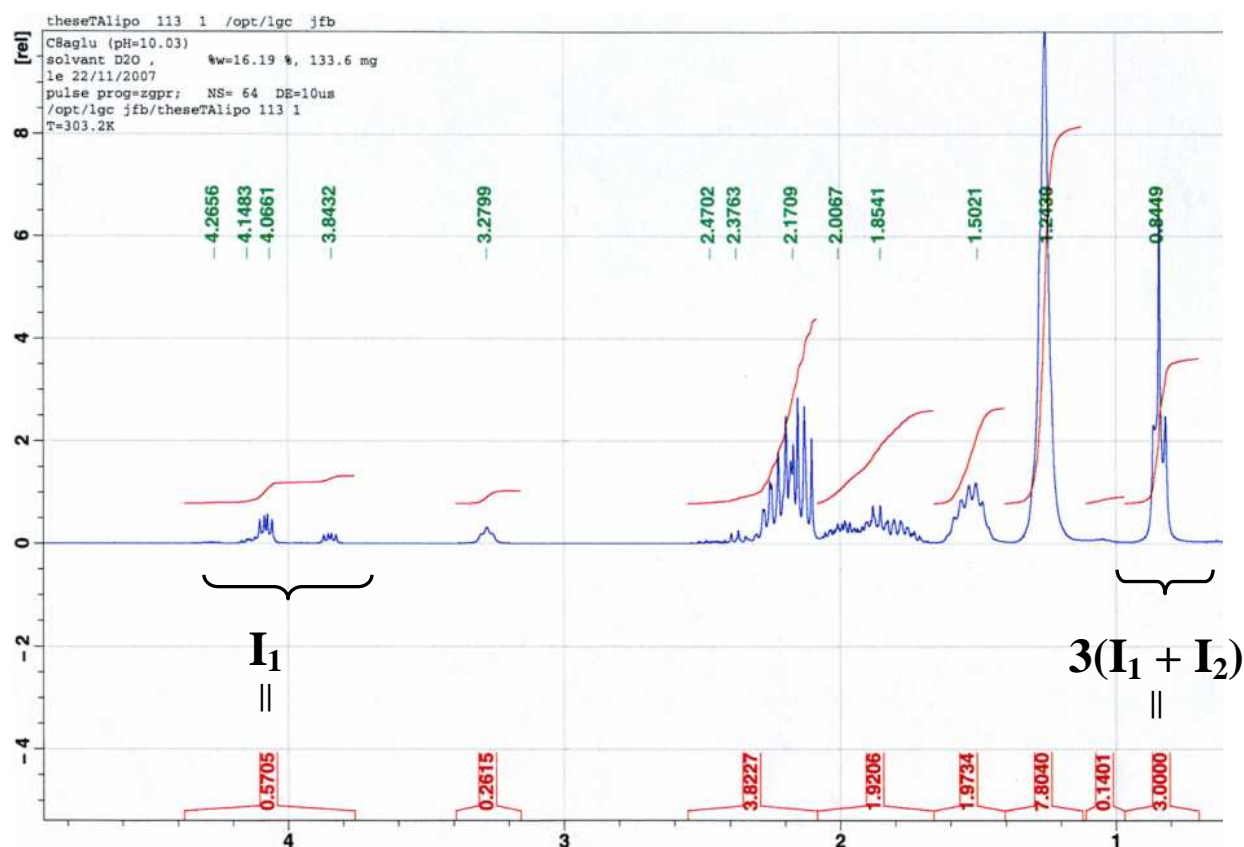


Figure IV-18 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium – calcul du rendement

$R_P$  représente donc le ratio molaire de la quantité de tensioactifs lipoaminoacides sur la quantité totale de tensioactifs du mélange final.  $R_S$  représente le ratio molaire de la quantité d'alcanolate de sodium sur la quantité totale de tensioactifs du mélange final.

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

Ces deux grandeurs correspondent donc au rendement de la *N*-acylation après traitement. Puisque, la *N*-acylation est réalisée avec un excès de chlorure d'acide (1,5 éq. par rapport à l'acide aminé), **R<sub>P</sub> ne peut être supérieur à 66%**. De bons résultats sont donc obtenus (Tableau IV-8). La plus grande proportion de tensioactifs lipoaminoacides est obtenue avec la leucine et une chaîne alkyle à 12 atomes de carbone.

Les valeurs de R<sub>S</sub> et R<sub>P</sub> obtenues pour les différentes formulations sont données avec une incertitude de 10%. Celle-ci vient principalement de l'erreur sur les valeurs d'intégration des spectres RMN <sup>1</sup>H.

Nous avons déterminé par le calcul, à partir de η<sub>AA</sub>, le taux de conversion de la réaction de *N*-acylation en fonction du chlorure d'acide (η<sub>ROCl</sub>) introduit en excès (Equation IV-4), afin de comparée cette grandeur avec R<sub>P</sub> (Tableau IV-8).

$$\eta_{ROCl} (\%) = \frac{\eta_{AA}}{1,5} \quad \text{Équation IV-4}$$

	formulation à base d'acylarginine				formulation à base d'acylleucine				formulation à base d'acide acylglutamique			
chaîne acyle	η <sub>AA</sub> (%)	η <sub>ROCl</sub> (%)	R <sub>P</sub> (%)	R <sub>S</sub> (%)	η <sub>AA</sub> (%)	η <sub>ROCl</sub> (%)	R <sub>P</sub> (%)	R <sub>S</sub> (%)	η <sub>AA</sub> (%)	η <sub>ROCl</sub> (%)	R <sub>P</sub> (%)	R <sub>S</sub> (%)
C8	77	51	45	55	88	59	45	55	75	50	55	45
C10	84	56	42	58	87	58	51	49	53	35	24	76
C12	90	60	39	61	87	53	55	45	64	43	38	62

**Tableau IV-8 : Taux de conversion (η) et rendements (R) de la réaction de *N*-acylation des acides aminés  
modèles déterminés par RMN <sup>1</sup>H**

Les valeurs de η<sub>ROCl</sub> et R<sub>P</sub> qui représentent toutes deux le taux de lipoaminoacides par rapport à la quantité totale de tensioactifs dans le mélange sont différentes. Ces différences s'expliquent par le fait que η<sub>ROCl</sub> est mesuré (dosage OPA) avant traitements du milieu réactionnel, alors que R<sub>P</sub> est déterminé (dosage RMN) après traitements. La différence entre ces deux valeurs est donc due à la perte d'une fraction de produit, partiellement soluble dans l'acétone, lors du passage des produits sous forme sel de sodium.

$R_p$  dépend donc de la solubilité des produits. C'est pourquoi il est important de distinguer le taux de conversion ( $\eta$ ) au rendement final ( $R$ ) de la réaction de *N*-acylation.

L'étude des signaux RMN montre que l'arginine et la leucine ont bien été éliminées lors de la précipitation du mélange de tensioactifs. L'arginine et la leucine, sous forme basique, sont solubles dans l'acétone contrairement au glutamate de sodium, non soluble. Ce dernier est donc présent dans la formulation finale. Le ratio  $R_G$ , qui représente le ratio molaire de la quantité d'acide glutamique présent dans le mélange final par rapport à la quantité totale de *N* <sup>$\alpha$</sup> -acylglutamate de sodium et de glutamate de sodium, est calculé selon l'Équation IV-5 :

$$R_G = \frac{I_G}{I_G + I_{AG}} \times 100 \quad \text{Équation IV-5}$$

$I_G$  : valeur de l'intégrale correspondant au proton du carbone asymétrique du glutamate de sodium

$I_{AG}$  : valeur de l'intégrale correspondant au proton du carbone asymétrique (H 5) des *N* <sup>$\alpha$</sup> -acylglutamates de sodium

Pour la *N*-acylation avec l'acide glutamique et le chlorure d'octanoyle, on trouve un  $R_G$  de 40%, alors que le taux de conversion  $\eta_{AA}$  est de 75%. On s'attendrait donc à avoir un  $R_G$  de 25%. Cette valeur élevée de  $R_G$  est due à la perte, lors de la précipitation du mélange dans l'acétone, d'une fraction de sel de *N* <sup>$\alpha$</sup> -acylglutamate de sodium partiellement soluble dans ce solvant.

chaîne alkyle	$\eta_{AA}$ (%)	$R_G$ (%)
C8	75	40
C10	53	46
C12	64	43

**Tableau IV-9 :  $\eta_{AA}$  des réactions de *N*-acylation de l'acide glutamique et  $R_G$  des formulations finales à base de *N* <sup>$\alpha$</sup> -acylglutamates de sodium en fonction de la longueur de la chaîne alkyle**

### IV.2.1.3. Conclusion

**La *N*-acylation des fonctions amines par des chlorures d'acide de 8 à 12 atomes de carbone, après optimisation, donne des taux de conversion différents (de 53 à 90%) en fonction de la nature de l'acide aminé et de la longueur de la chaîne greffée.** Les acides aminés basiques et neutres sont plus facilement acylés par rapport aux acides aminés acides. Cette différence de réactivité serait expliquée par la présence de réactions secondaires, conduisant à la formation d'anhydride.

Des étapes de purification des milieux réactionnels ont permis l'élimination des composés non amphiphiles, à l'exception du glutamate de sodium. Ce dernier reste donc présent comme soluté, dans les formulations finales.

La caractérisation des mélanges ainsi obtenus a pu être déterminée grâce à une étude en spectrométrie RMN. Celle-ci a montré que les mélanges sont constitués de différents isomères. Selon la nature de l'acide aminé, la proportion des différents isomères varie. Il serait donc intéressant d'étudier les conditions opératoires qui permettraient d'obtenir un éventail de structures d'acides aminés *N*-acylés. **Les mélanges de tensioactifs sont constitués de 40 à 55% de sels de *N*<sup>α</sup>-acylaminés de sodium et de 45 à 60% d'alcanoate de sodium**, excepté pour les mélanges obtenus à partir de l'acide glutamique qui sont contaminés par une fraction de glutamate de sodium résiduel. **Ainsi, on obtient des mélanges binaires anionique/anionique ou anionique/amphotère en fonction de la nature de l'acide aminé.** Les propriétés tensioactives de ces formulations sont ensuite mesurées.

La *N*-acylation de Schotten-Baumann est étendue aux hydrolysats protéiques. Il est attendu l'obtention de mélanges de molécules tensioactives majoritairement anioniques, de structures complexes, de configurations diverses.

## IV.2.2. La *N*-acylation de l'hydrolysats protéique de pois

### IV.2.2.1. Introduction

La réaction de *N*-acylation peut être réalisée directement après l'hydrolyse des protéines de pois sans traitement intermédiaire. En effet, à la fin de l'hydrolyse, les peptides et acides aminés sont dans l'eau à une concentration de 10%. Or, cette concentration prédispose ces substrats à réagir dans les conditions opératoires mises au point pour mener la *N*-acylation, à l'ajustement du pH près.

Au regard des travaux décrits dans la littérature (chapitre I, paragraphe I.2.3.1.) et des propriétés des formulations obtenues à partir des acides aminés purs (paragraphe IV.3.1.), nous avons choisi d'utiliser le chlorure d'acide en C12. La réaction de *N*-acylation avec le chlorure de dodécanoyle et des hydrolysats de protéines résultant de degrés d'hydrolyse différents a donc été étudiée. Pour cela, toutes les synthèses ont été réalisées en duplicats.

#### IV.2.2.2. Résultats et discussion

Dans les conditions opératoires précédemment définies (ajout de 1,5 éq. de chlorure de dodécanoyle par rapport aux fonctions amines des hydrolysats protéique, dans la solution d'hydrolysat protéique, à pH 10 et à température ambiante ; puis élévation de la température du milieu réactionnel à 50°C, maintien de cette température et du pH basique, pendant 3 h), une première série d'expériences a été réalisée sur 5 g d'hydrolysat, résultant d'une hydrolyse avec des degrés d'hydrolyse compris entre 16 et 36%, sous agitation mécanique. Les taux de conversion des fonctions amines libres ( $\eta_{\text{NH}_2}$ ), calculés selon l'Équation IV-1, sont compris entre 73 et 77% (Tableau IV-10).  $\eta_{\text{NH}_2}$  ne semble pas être influencé par le degré d'hydrolyse des hydrolysats.

Afin d'améliorer la mise en contact des réactifs et donc d'accroître leur réactivité, un mode d'agitation différent a été utilisé à l'aide du Turbotest Raynerie. Les résultats obtenus (Tableau IV-10) confirment un gain de réactivité avec ce type d'agitation. En effet, un meilleur taux de conversion ( $\eta_{\text{NH}_2} = 83\%$ , soit un gain de plus de 10%) est obtenu lors de la *N*-acylation.

DH de l'hydrolyse des hydrolysats protéiques (%)	mode d'agitation	$\eta_{\text{NH}_2}$ (%)
17	mécanique	73
26	mécanique	77
36	mécanique	75
32	Turbotest Raynerie	83

**Tableau IV-10 : Taux de conversion des fonctions amines lors de la réaction de *N*-acylation en fonction du degré d'hydrolyse des hydrolysats utilisés et du mode d'agitation**

#### IV.2.2.3. Traitements des mélanges

En vue d'évaluer les propriétés tensioactives des mélanges obtenus, trois traitements ont été envisagés. Les lots de peptides acylés, issus de protéines hydrolysées avec des degrés d'hydrolyse de 17, 26 et 36%, ont été uniquement séchés sous vide. Le lot correspondant à un degré d'hydrolyse de 32% a été lyophilisé et divisé en deux parties. L'une a été utilisée en l'état, l'autre a été dialysée afin de purifier le milieu et d'éliminer les sels inorganiques formés au cours de l'hydrolyse et de l'acylation. Les membranes de dialyse, disponibles commercialement et utilisées dans notre étude, ont des seuils de coupure de 100 et 500 Da.

Les masses des mélanges récupérées après dialyse sont déterminées. Seul 20 à 25% de la masse de l'échantillon est récupérée, après dialyse, avec une membrane ayant un seuil de coupure de 500 Da et 40%, avec une membrane ayant un seuil de coupure de 100 Da. Il est donc très probable, qu'en plus des sels inorganiques, les petites molécules, telles que le dodécanoate de sodium ( $M = 222$  Da) ou les sels de sodium d'acides aminés acylés ( $M_{\text{moy}} = 319$  Da) ou non ( $M_{\text{moy}} = 136$  Da) soient également éliminées. Cette hypothèse est confirmée par la présence de mousse dans l'eau dans laquelle baignent les boudins de dialyse.

Ces étapes de purification nous permettent de comparer les propriétés des mélanges non dialysés composés, entre autre, de dodécanoate de sodium et de sels de sodium de peptides acylés, à celles des formulations dialysées composées de sels de sodium de peptides acylés.

#### **IV.2.2.4. Conclusion**

**Des mélanges de molécules amphiphiles constitués de sels de sodium de peptides et d'acides aminés *N*<sup>a</sup>-acylés et de dodécanoate de sodium ont été produits sous des conditions opératoires douces (50°C, pression atmosphérique, temps de réaction de 3h30 dont 30 min pour l'hydrolyse et 3 h pour la *N*-acylation), sans solvant organique (réactions dans l'eau), sans étape de purification et sans formation de déchet organique, ce qui représente une économie d'atomes et s'inscrit parfaitement dans le concept de « chimie verte ». Les taux de conversion des fonctions amines obtenus lors du greffage de la chaîne grasse atteignent 83%.**

**Une formulation de tensioactifs anioniques directement utilisable est donc obtenue.** En effet, les molécules amphiphiles présentes dans le mélange sont majoritairement anioniques en raison des fonctions carboxylates des chaînes latérales (25% d'acide aspartique et glutamique dans la protéine), des fonctions carboxylates terminales des peptides et des acides aminés, et du dodécanoate de sodium.

Nous avons dès lors étudié les propriétés tensioactives de ces formulations et nous les avons comparées à celles de tensioactifs de référence.

### **IV.3. Mesures des propriétés tensioactives**

Quelques propriétés tensioactives des formulations précédemment obtenues ont été mesurées et comparées avec celles des tensioactifs commerciaux, dont nous avons évalué également les propriétés tensioactives, afin d'évaluer l'efficacité des formulations obtenues.

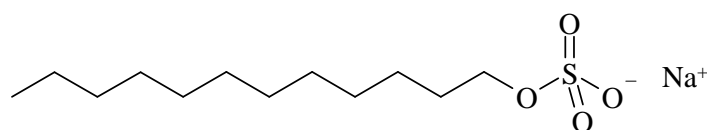
#### **IV.3.1. Mesures des propriétés tensioactives des formulations obtenues par *N*-acylation des acides aminés modèles**

##### **IV.3.1.1. Tension de surface (TS) et concentration micellaire critique (CMC)**

Les mesures de tension de surface en fonction de la concentration en tensioactifs sont effectuées sur les mélanges de tensioactifs obtenus précédemment à partir des acides aminés modèles, ainsi que sur les sels d'alcanoate de sodium seuls et sur le dodécylsulfate de sodium

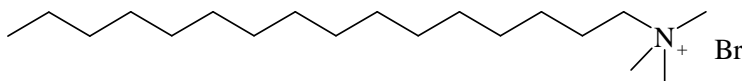
(SDS) et le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) qui servent de référence en tant que tensioactifs pétrochimiques commerciaux.

En effet le SDS est un tensioactif anionique commercial largement utilisé en industrie pharmaceutique et dans les domaines cosmétique et alimentaire en tant qu'agent émulsifiant ou dispersant. Il se présente sous forme de cristaux blancs solubles dans l'eau (0,1 M à 20°C). Sa forme développée est représentée Figure IV-19.



**Figure IV-19 : Formule développée du SDS**

Le CTAB est un tensioactif cationique commercial. Il est utilisé dans les produits cosmétiques, les produits de soin des cheveux, en raison de ses propriétés émulsifiantes. Il est également utilisé dans les désinfectants et produits d'hygiène pour ses propriétés biocides. Sa forme développée est représentée Figure IV-20



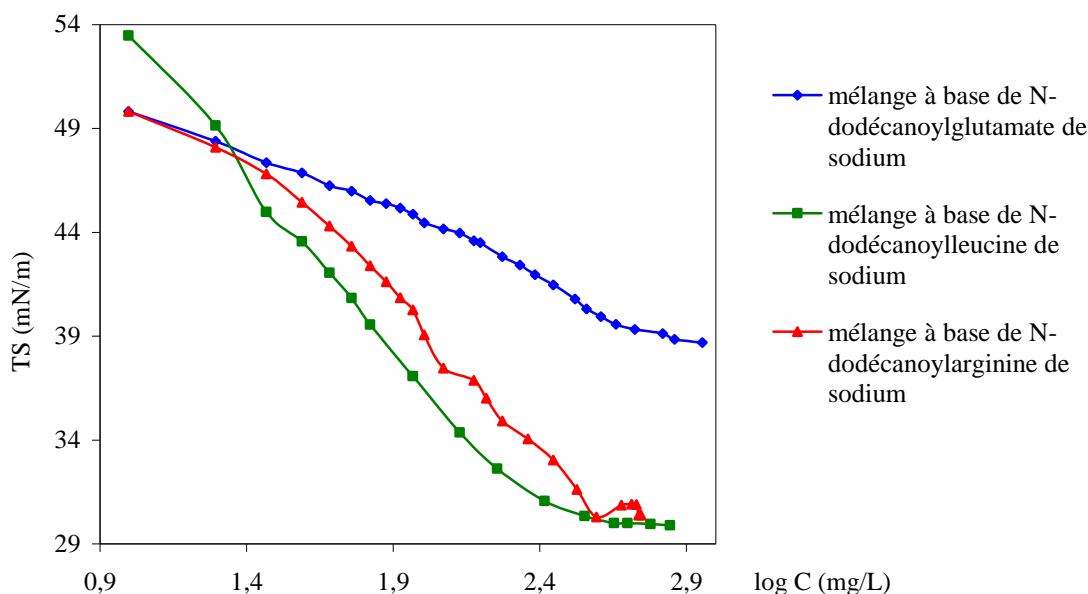
**Figure IV-20 : Formule développée du CTAB**

Ces deux tensioactifs commerciaux ne présentent pas les mêmes fonctionnalités que les mélanges de tensioactifs obtenus à partir de l'isolat protéique de pois. Ils servent donc de référence en tant que tensioactifs pétrochimiques largement usités.

Les mesures des propriétés tensioactives sur les références acides aminés acylés non pas été réalisées car ces derniers ne sont pas disponibles commercialement, excepté le lauroylglutamate de sodium. Toutefois, lorsque leurs propriétés de surface sont données dans la littérature, nous les avons comparées à celles des mélanges précédemment obtenus.



Une baisse linéaire de la tension de surface est observée quand la concentration en tensioactifs augmente jusqu'à la CMC, au-delà de laquelle la tension de surface évolue peu (Figure IV-21). Ce comportement est commun aux tensioactifs en solution.



**Figure IV-21 : Tension de surface en fonction de la concentration en formulation obtenue pour des solutions de sels de sodium d'acides  $N^{\alpha}$ -dodécanoylaminés**

Des CMC élevées sont observées pour les formulations avec une chaîne alkyle à 8 atomes de carbone (Tableau IV-11). En effet, plus la chaîne carbonée est longue, plus elle est hydrophobe et plus elle est capable d'abaisser la tension de surface. Ceci est attribué à l'augmentation de l'affinité des molécules lipophiles pour les interfaces (Sanchez-Vioque and al. 2004). Quelle que soit la nature de la tête hydrophile des acides acylaminés, seules les formulations avec les chaînes à 12 atomes de carbone ont des CMC voisines de celles du SDS et du CTAB.

La charge de la tête polaire semble également avoir une influence sur la CMC. Pour une même longueur de chaîne, la CMC des mélanges dérivés de la leucine est inférieure à celle des mélanges dérivés de l'arginine. Les sels de  $N^{\alpha}$ -acylleucines de sodium ont une tête anionique, tandis que celle des sels de  $N^{\alpha}$ -acylarginines de sodium est amphotère. D'autre part, les valeurs de CMC élevées des mélanges dérivés de l'acide glutamique peuvent être expliquées par la présence de glutamate de sodium résiduel dans ces formulations. En effet,

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

l'évaluation de la tension de surface d'une solution de cet acide aminé a montré que ce dernier ne possède pas de propriétés tensioactives. Sa présence entraîne donc une augmentation des valeurs de CMC. En effet, la CMC de la solution de *N*<sup>α</sup>-dodécanoylglutamate de sodium est de 338 mg/L (Xia and al. 1996) et celle du dodécanoate de sodium de 70 mg/L, tandis que celle du mélange obtenu à partir de la *N*-acylation de l'acide glutamique avec le chlorure de dodécanoyle est de 800 mg/L.

Les formulations obtenues à partir du chlorure de dodécanoyle et de décanoyle ont une tension de surface à la CMC comparable, voire plus basse que celle du SDS et du CTAB. Cependant, les formulations avec des chaînes carbonées en C10 ont une CMC élevée. **Seules les formulations obtenues à partir du chlorure de dodécanoyle ont donc des propriétés de surface très intéressantes.**

**Le dodécanoate de sodium a une CMC très faible. Il contribue donc bien aux propriétés des formulations obtenues à l'aide du chlorure de dodécanoyle.**

	acylarginine		acylleucine		acide acylglutamique		acide carboxylique	
chaîne carbonée	CMC (mg/L)	TS (mN/m)	CMC (mg/L)	TS (mN/m)	CMC (mg/L)	TS (mN/m)	CMC (mg/L)	TS (mN/m)
C8	>2500	/	1100±100	34,1±0,5	>2500	/	>2500	/
C10	1500±150	26,0±0,5	560±40	37,8±0,5	1930±90	27,5	2700±150	27,7±0,5
C12	<b>410±40</b>	<b>30,2±0,5</b>	<b>310±80</b>	<b>30,1±0,5</b>	800±60	38,7	70±20	31,0±0,5

SDS : CMC = 240 ± 30 mg/L; TS = 39,1 ± 0,5 mN/m

CTAB : CMC = 230 ± 30 mg/L; TS = 37,2 ± 0,5 mN/m

**Tableau IV-11 : CMC et tension de surface à la CMC des mélanges à base de sels de *N*<sup>α</sup>-acylaminés de sodium et de tensioactifs commerciaux**

Pour le mélange *N*<sup>α</sup>-décanoylleucine/décanoate de sodium (dont le ratio molaire est de 51/49), une CMC de 560 mg/L est obtenue. Cette valeur est inférieure à la CMC de la solution de *N*<sup>α</sup>-décanoylleucine seule, qui est de 976 mg/L (Godtfredsen and Bjoerkling 1990) et à celle du décanoate de sodium seul, qui est de 2700 mg/L. **Une synergie de type réduction de la**

**CMC est donc observée pour ce mélange entre le décanoate de sodium, tensioactif anionique et le  $N^\alpha$ -décanylleucine, tensioactif anionique.** La tension de surface à la CMC de ce mélange (37,8 mN) est comparable à celle de la solution de  $N^\alpha$ -décanylleucine seule (37,0 mN) (Godtfredsen and Bjoerkling 1990).

Pour le mélange  $N^\alpha$ -dodécanylleucine/dodécanoate de sodium (dont le ratio molaire est de 55/45), une tension de surface à la CMC de 30,1 mN/m est obtenue. Cette valeur est inférieure à la tension de surface à la CMC de la solution de  $N^\alpha$ -dodécanylleucine seul (34 mN/m) (Godtfredsen and Bjoerkling 1990) et à celle du dodécanoate de sodium seul (31,0 mN/m).

**Une synergie de type réduction de la tension de surface est donc observée pour ce mélange entre le dodécanoate de sodium et le  $N^\alpha$ -dodécanylleucine.** La CMC de ce mélange (310 mg/L) est intermédiaire entre celle de la solution de  $N^\alpha$ -décanylleucine seule (766 mg/L) (Godtfredsen and Bjoerkling 1990) et celle du dodécanoate de sodium (70 mg/L).

Pour les mélanges obtenus à partir de l'arginine, de telles comparaisons n'ont pas pu être réalisées en raison de l'absence de données dans la littérature et de l'indisponibilité des  $N^\alpha$ -acylarginines commerciaux.

Les valeurs de CMC pour les mélanges dérivés de l'arginine et de la leucine sont inférieures à celles des alkylpolyglucosides dont la CMC varie de 5000 à 7250 mg/L, pour les dérivés avec une chaîne grasse de C8, et de 590 à 660 mg/L, pour ceux ayant une chaîne carbonée à 12 carbones (Nickel and al. 1997).

#### **IV.3.1.2. Les propriétés moussantes**

La quantité de mousse produite varie avec la quantité de tensioactif pour des concentrations inférieures à la CMC. C'est pourquoi les mesures de propriétés moussantes sont réalisées à une concentration supérieure à la CMC.

Les résultats des propriétés moussantes sont rassemblés dans le Tableau IV-12. **Quelle que soit la nature de la tête hydrophile, plus la chaîne lipophile est courte, plus la capacité moussante est faible.** Lorsque la chaîne carbonée augmente, le caractère lipophile de la molécule s'accroît et la tension à l'interface eau/air diminue. Les mélanges à base de sels de  $N^\alpha$ -dodécanyl-,  $N^\alpha$ -décanyl-arginine de sodium et de sel de  $N^\alpha$ -dodécanylleucine de sodium ont une bonne capacité moussante. Ces résultats sont en accord avec les travaux décrits dans la littérature (Benoit and Bac 1999). De plus, les mélanges contiennent

également des sels d'alcanoate de sodium. Ce sont donc des mélanges binaires. Or, la synergie des mélanges binaires de tensioactifs est plus importante lorsque la charge de ces derniers est différente (Rosen and Zhu 1984). Ainsi un mélange de deux tensioactifs anionique et amphotère doit avoir une meilleure synergie qu'un mélange de deux tensioactifs anioniques ou de deux tensioactifs amphotères. Les valeurs de volume de mousse obtenues pour ces mélanges sont comparables à celle du SDS commercial, connu pour ses propriétés moussantes. Ceci démontre que ces formulations sont de bons agents moussants. Les solutions à base des formulations dérivées de l'acide glutamique ont de moins bonnes capacités moussantes. Ces plus faibles capacités moussantes pourraient être attribuées à la présence de glutamate de sodium résiduel dans le mélange et/ou à la production d'une synergie négative due aux forces de répulsions entre les têtes simplement et doublement chargées pour les alcanoates de sodium et les *N*<sup>a</sup>-acylglutamates de sodium, respectivement (Rosen 1991). La détermination des propriétés moussantes d'un mélange binaire dodécanoate de sodium/dodécanylglycinate de sodium permettrait de trancher sur ces hypothèses.

chaîne carbonée	acylarginine	acylleucine	acide acylglutamique	acide carboxylique
C8	160 ± 5	0	0	150 ± 5
C10	180 ± 5	140 ± 5	70 ± 5	190 ± 5
C12	180 ± 5	200 ± 5	120 ± 5	200 ± 5

SDS : 230 ± 5%

CTAB : 210 ± 5%

**Tableau IV-12 : Capacité moussante (%) des formulations à base des sels de *N*<sup>a</sup>-acylaminés de sodium et des tensioactifs commerciaux**

Un second paramètre majeur lorsqu'on étudie les propriétés moussantes concerne la stabilité des mousses dans le temps. Les mousses sont des systèmes thermodynamiquement instables. La déstabilisation est consécutive à trois phénomènes majeurs : la remontée des bulles concomitante au drainage du liquide sous l'effet de la gravité, la solubilisation du gaz dans la

phase liquide (mûrissement d'Ostwald) et la coalescence qui recouvre plusieurs phénomènes complexes (Franses and al. 2004).

Les résultats de la stabilité moussante sont présentés sur la Figure IV-22. Une tête hydrophile combinée à une chaîne hydrophobe de 10 et 12 atomes de carbone confère une bonne stabilité moussante aux formulations à base de sel de  $N^{\alpha}$ -acylarginine de sodium en raison de la nature amphotère de leur tête polaire. En effet, le caractère amphotère d'un tensioactif améliore la capacité mais aussi la stabilité moussante (Basheva and al. 2000). Par contre, les formulations obtenues à partir de la  $N$ -acylation de la leucine ne possèdent pas de bonne stabilité moussante. En effet, au-delà d'une heure, la mousse a complètement disparu.

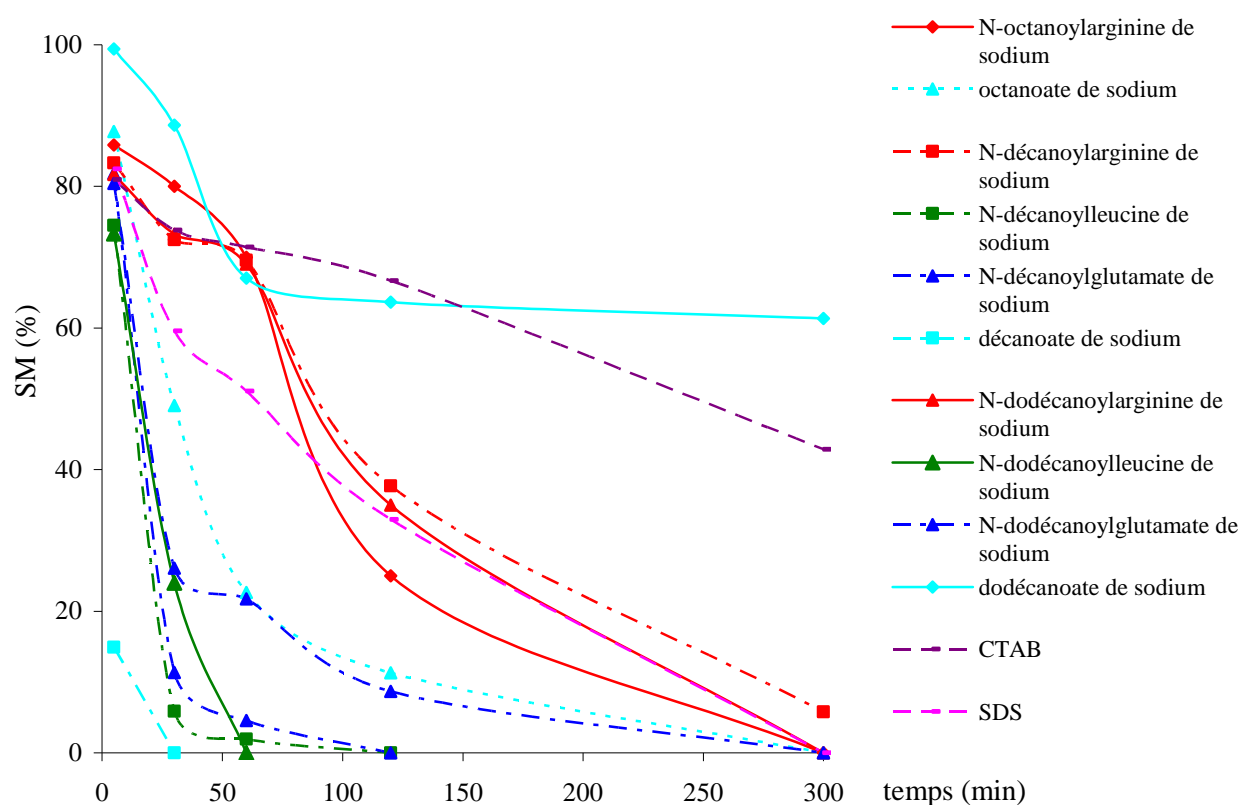


Figure IV-22 : Mesures des stabilités moussantes des formulations à base des sels de  $N^{\alpha}$ -acylaminés de sodium et des références

### IV.3.1.3. Conclusion

A l'exception de celles obtenues à partir de l'acide glutamique, en raison de la présence de glutamate de sodium résiduel, **les formulations de tensioactifs obtenues à partir des acides**

**aminés modèles, sont des mélanges binaires. Elles ont donné des propriétés tensioactives intéressantes.** Il semble que formulations obtenues à partir de l'acide glutamique sont nettement moins intéressantes comparées aux autres formulations. Cela est probablement dû à la présence de glutamate de sodium, qui contamine ces formulations et perturbe les mesures des propriétés tensioactives, et/ou à l'existence d'une synergie négative due aux forces de répulsions entre les têtes simplement et doublement chargées pour les alcanates et les  $N^{\alpha}$ -acylglutamates de sodium, respectivement. En effet, les  $N^{\alpha}$ -acylglutamates seuls possèdent de bonnes propriétés tensioactives (chapitre I, paragraphe I.2.4.), contrairement aux résultats obtenus. Les différents mélanges de tensioactifs obtenus à partir des substrats modèles ont des propriétés tensioactives différentes et peuvent présenter des synergies. Ces différences de comportement peuvent être attribuées aux différences structurales des composés obtenus, que ce soit au niveau de la partie hydrophile (nature de la chaîne latérale de l'acide aminé, variation des proportions des différents isomères obtenus) ou de la partie hydrophobe (longueur de la chaîne alkyle). **Cependant, quelque soit la nature de la partie hydrophile, les meilleures propriétés ont été obtenues avec les mélanges de composés amphiphiles possédant une chaîne lipophile à 12 atomes de carbone.**

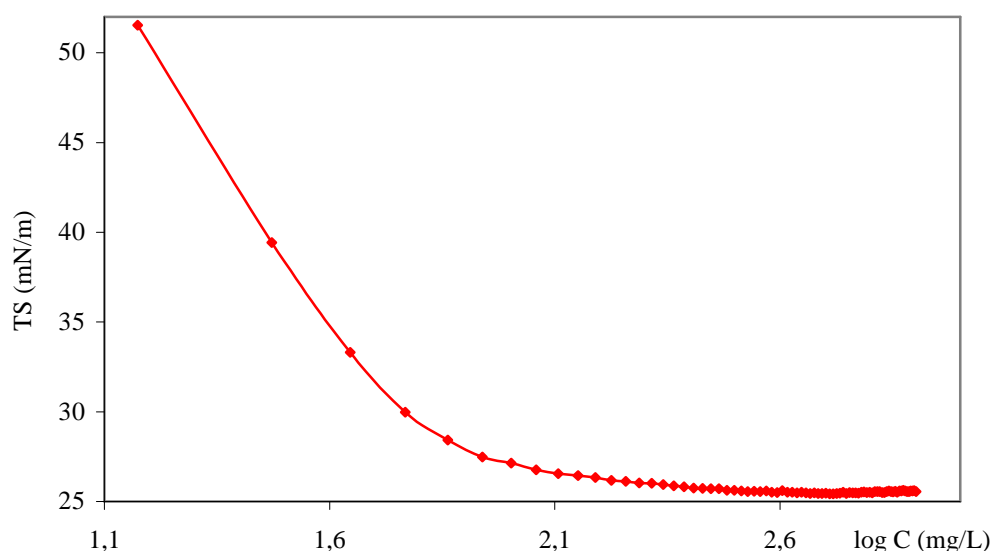
### **IV.3.2. Mesures des propriétés tensioactives des formulations de tensioactifs anioniques obtenus à partir des protéines de pois**

#### **IV.3.2.1. Tension de surface et concentration micellaire critique**

La tension de surface en fonction de la concentration est mesurée pour l'isolat protéique de départ, les hydrolysats protéiques et les hydrolysats protéiques acylés avec le chlorure de dodécanoyle (Figure IV-23 et Tableau IV-13). L'isolat protéique et les protéines hydrolysées n'ont pas de CMC. La tension de surface diminue lentement lorsqu'ils sont ajoutés à la solution tampon phosphate. Cependant, on arrive à la limite de solubilité de ces derniers avant d'atteindre une éventuelle valeur de CMC. Ce résultat n'est pas surprenant car les peptides ne possèdent pas de structure amphiphile, or celle-ci est indispensable pour induire la diminution de la tension de surface d'une interface. Par contre, les peptides acylés ont des valeurs de CMC comparables aux tensioactifs commerciaux qui sont comprises entre 75 et 220 mg/L, avec une tension de surface faible comprise entre 26,2 et 28,4 mN/m. La longueur de la chaîne peptidique semble avoir une influence sur la CMC des mélanges d'agents tensioactifs.

En effet, plus le degré d'hydrolyse est important, donc plus la taille du peptide est faible, meilleures sont les valeurs de CMC. Plus les peptides sont courts, plus la partie hydrophobe du tensioactif par rapport à sa partie hydrophile est importante et donc plus sa CMC est faible.

**La tension de surface à la CMC est comparable pour toutes les formulations à base de sels de sodium de peptides acylés, quelle que soit la longueur moyenne de leur tête hydrophile. Elle est inférieure aux tensioactifs commerciaux et au dodécanoate de sodium ce qui fait d'eux de meilleurs détergents (Sanchez-Vioque and al. 2004).**



**Figure IV-23: Tension de surface de la formulation à base d'isolat protéique hydrolysé (DH = 32%), acylé et lyophilisé, en fonction du logarithme de la concentration**

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

		CMC (mg/L)	TS à la CMC (mN/m)
formulations à base d'isolat protéique hydrolysé, acylé et séché sous vide	DH = 17%	220 ± 20	26,6 ± 0,5
	DH = 26%	190 ± 20	26,9 ± 0,5
	DH = 36%	85 ± 30	26,2 ± 0,5
formulation à base d'isolat protéique hydrolysé, acylé sous agitation (Turbotest) et lyophilisé (DH = 32%)		75 ± 10	28,4 ± 0,5
dodécanoate de sodium		70 ± 20	31,0 ± 0,5
SDS		240 ± 30	39,1 ± 0,5
CTAB		230 ± 30	37,2 ± 0,5

**Tableau IV-13: Valeurs des CMC et tensions de surface à la CMC des formulations tensioactives anioniques obtenues à partir des protéines de pois et de tensioactifs commerciaux**

La tension de surface en fonction de la concentration de la formulation obtenue à partir de l'isolat protéique hydrolysé (DH = 32%), acylé (DA = 83%), dialysé (avec des membranes dont le seuil de coupure est de 100 et 500 Da), puis lyophilisé a été également mesurée afin d'étudier l'impact de ce procédé de séparation sur les propriétés tensioactives du mélange (Tableau IV-14). **Les CMC obtenues avant et après dialyse sont comparables.** En effet, la fraction éliminée par dialyse renferme à la fois des sels inorganiques, des acides aminés et des peptides non acylés qui ne possèdent pas de propriété tensioactive. Mais, des molécules amphiphiles telles que le dodécanoate de sodium ou les acides aminés acylés sont également éliminées. Il semble que leur présence simultanée doit inhiber les propriétés globales de cette fraction éliminée. Il n'est donc pas surprenant d'obtenir des CMC proches pour des formulations dialysées ou non.

**Par ailleurs, les résultats de tension de surface semblent indiquer l'existence d'une synergie entre les peptides acylés et l'acide gras résiduel.** En effet, pris séparément, leur tension de surface est comparable, alors que lorsqu'ils sont en mélange dans les formulations non dialysées, celle-ci est diminuée. En effet, la tension de surface passe de 32,2 mN/m à 28,4 mN/m. Des interactions électrostatiques pourraient modifier les propriétés de surface de ce mélange (paramètre  $\beta$  plus négatif).



		CMC (mg/L)	TS à la CMC (mN/m)
formulations à base d'isolat protéique hydrolysé (DH = 32%), acylé et lyophilisé	dialysé (seuil de coupure = 100 Da)	70 ± 2	32,2 ± 0,1
	dialysé (seuil de coupure = 500 Da)	85 ± 5	31,3 ± 0,3
	non dialysé	75 ± 10	28,4 ± 0,5
dodécanoate de sodium		70 ± 20	34,1 ± 0,5

**Tableau IV-14 : Valeurs des CMC et tensions de surface à la CMC des formulations obtenues à partir d'isolat protéique hydrolysé (DH = 32%), acylé, lyophilisé et dialysé ou non, et du dodécanoate de sodium**

#### IV.3.2.2. Les propriétés moussantes

L'isolat protéique a une très faible capacité moussante (CM = 25%). Après hydrolyse de ce dernier, les peptides ne produisent plus de mousse sous l'action de l'agitation (CM = 3 à 12%). Plus le degré d'hydrolyse de l'isolat protéique est important, plus la capacité moussante des peptides obtenus est faible. Du fait de leur plus petite taille, les régions hydrophobes et hydrophiles ne sont plus différenciées dans les peptides, contrairement aux protéines (Sanchez-Vioque and al. 2004). Ils ne possèdent donc pas de caractère amphiphile et ne s'adsorbent pas à l'interface eau/air.

**Après acylation, les lipopeptides possèdent une capacité moussante comparable à celle des tensioactifs commerciaux, qui peut atteindre 230%** (Tableau IV-15). Les peptides acylés s'adsorbent préférentiellement à l'interface eau/air où ils forment un film stable, tandis que les peptides restent en solution sans participer à la formation de la mousse (Sanchez-Vioque and al. 2001).

Il n'y a pas d'influence notable du degré d'hydrolyse sur la capacité moussante. De plus, les formulations obtenues après dialyse ont une capacité moussante supérieure à leur homologue non dialysé. En effet, la dialyse permet d'éliminer le chlorure de sodium, améliorant ainsi la capacité moussante des formulations.

## CHAPITRE IV : OBTENTION DE MELANGES DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE DE LA CHAÎNE LIPOPHILE

formulations à base d'isolat protéique hydrolysé, acylé et séché sous vide	DH = 17%	210 ± 5
	DH = 26%	220 ± 5
	DH = 36%	230 ± 5
formulations à base d'isolat protéique hydrolysé (DH = 32%), acylé et lyophilisé	non dialysée	230 ± 5
	dialysé (seuil de coupure = 100)	260 ± 5
	dialysé (seuil de coupure = 500)	240 ± 5
dodécanoate de sodium		200 ± 5
SDS		230 ± 5
CTAB		210 ± 5

**Tableau IV-15 : Valeurs de la capacité moussante des formulations obtenues à partir d'hydrolysats  
protéiques acylés et de tensioactifs commerciaux**

**Les mousses formées avec les formulations à base d'hydrolysats protéiques acylés sont relativement stables comparées au SDS** (Figure IV-24). Après deux heures, le volume des mousses, quel que soit le degré d'hydrolyse utilisé pour obtenir les têtes hydrophiles, diminue de moitié par rapport au volume initial, contre près de 65% pour les mousses formées à partir d'une solution de SDS. Au bout de 5 h, il ne reste plus que 10 à 15% du volume de mousse de départ. En effet, les mousses produites avec le SDS sont constituées de petites bulles d'environ 150 µm de diamètre. Ces bulles coalescent assez rapidement, ce qui conduit à la destruction de la mousse (Sanchez-Vioque and al. 2001).

**Le degré d'hydrolyse utilisé pour l'obtention des têtes hydrophiles semble avoir une influence sur la stabilité des mousses. Plus le degré d'hydrolyse est élevé, plus la mousse est stable, surtout lors des deux premières heures.** En général, la stabilité moussante est reliée à l'étendue de l'adsorption des molécules amphiphiles à la surface. Plus une molécule amphiphile est hydrophobe, plus elle s'adsorbe à l'interface eau/air et donc plus la mousse formée est stable (Horiuchi and al. 1978; Larre and al. 2006). Or, plus les peptides sont longs, ce qui correspond à un degré d'hydrolyse plus faible, plus la partie hydrophile du tensioactif par rapport à sa partie hydrophobe est importante. C'est pourquoi ils stabilisent moins les mousses que les peptides acylés avec une longueur de chaînes peptidiques moyenne plus faible (degré d'hydrolyse plus élevé).

**Le mélange obtenu après dialyse possède une meilleure stabilité moussante que le mélange équivalent non dialysé.** La présence de chlorure de sodium dans les formulations non dialysées est probablement responsable de la réduction de la stabilité des mousses.

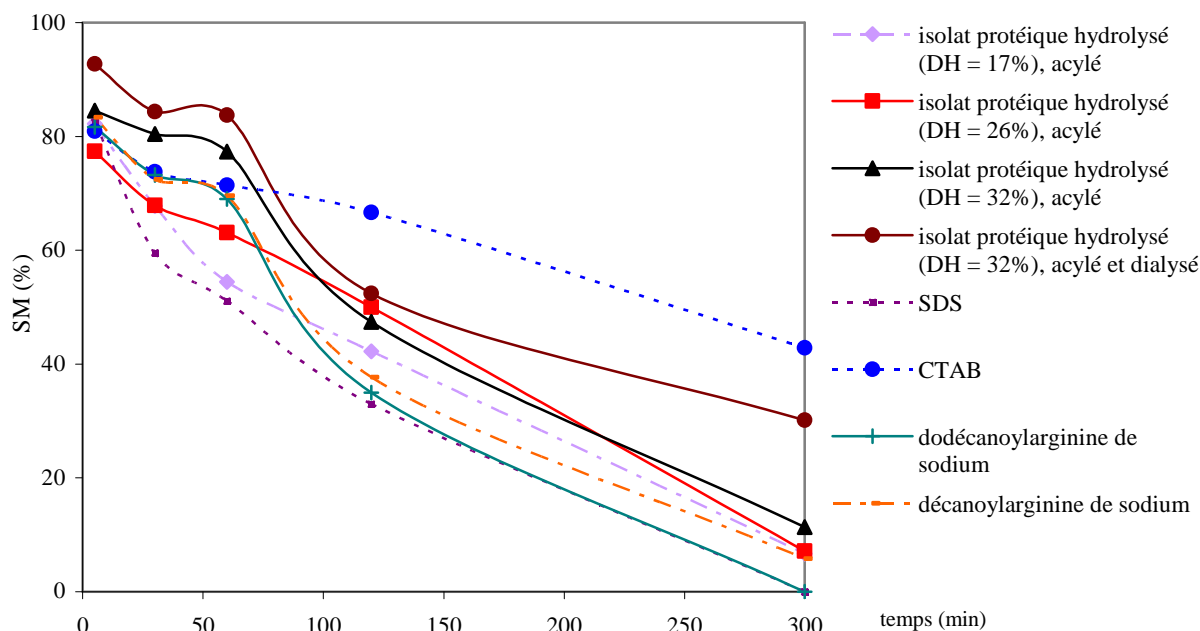


Figure IV-24 : Stabilités moussantes des formulations à base de peptides acylés.

**Les mélanges à base d'hydrolysats acylés possèdent de meilleures propriétés moussantes (capacité et stabilité moussante) que ceux à base d'acides aminés acylés.** Cela est probablement dû à l'existence d'une synergie des mélanges de tensioactifs majoritairement anioniques, mais aussi amphotères des formulations obtenues à partir des hydrolysats protéiques.

#### IV.3.2.3. Les propriétés émulsifiantes

Toutes les émulsions préparées sont de type huile dans eau. Les émulsions sont formées à partir de solutions aqueuses de protéines, d'hydrolysats peptidiques (DH = 32%), d'hydrolysats peptidiques acylés (DH = 32% et DA = 83%), de dodécanoate de sodium, de SDS et de CTAB. La lécithine a également été utilisée comme émulsifiant naturel de référence. C'est un composé dont les propriétés émulsifiantes sont connues. La lécithine ou

phosphatidylcholine est un lipide de la classe des phosphoacylglycérols. En d'autres termes, il s'agit donc d'un lipide formé à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras (Figure IV-25). Il est donc plus juste de parler des lécithines car il ne s'agit pas d'une seule molécule, mais d'un ensemble de molécules dont la composition en acide gras varie d'une lécithine à l'autre. Les lécithines (E322) sont utilisées comme émulsifiants dans l'industrie alimentaire.

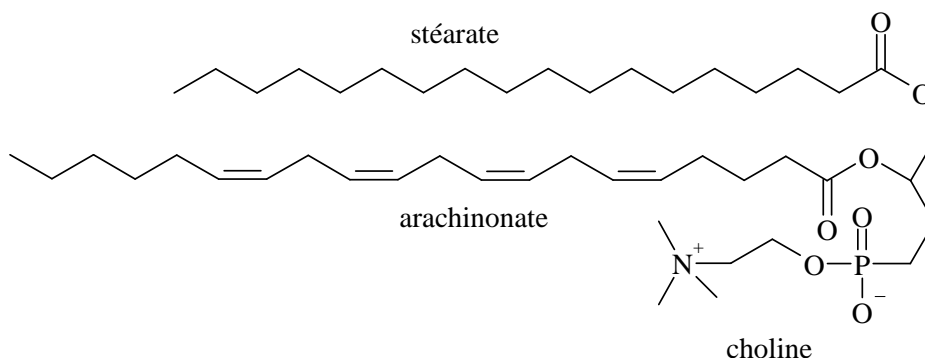


Figure IV-25 : Exemple de formule développée de lécithine

**Toutes les émulsions formées ont une capacité émulsionnante de 100%.** La stabilité des émulsions (SE) est mesurée au cours du temps (Figure IV-26). L'isolat protéique possède une bonne stabilité émulsionnante après 30 min. En effet, les différentes familles de protéines contenues dans le pois possèdent des propriétés émulsifiantes (Guéguen 1990; Garti 2001). Par contre, les peptides ont une très mauvaise stabilité émulsionnante. Nous avons constaté qu'ils avaient une faible capacité à abaisser la tension de surface aux interfaces, propriété indispensable à la stabilisation des émulsions. **Les émulsions à base de peptides acylés ont une moins bonne stabilité émulsifiante que celles des tensioactifs commerciaux. Après une heure, leur stabilité se rapproche de celle de la lécithine.**

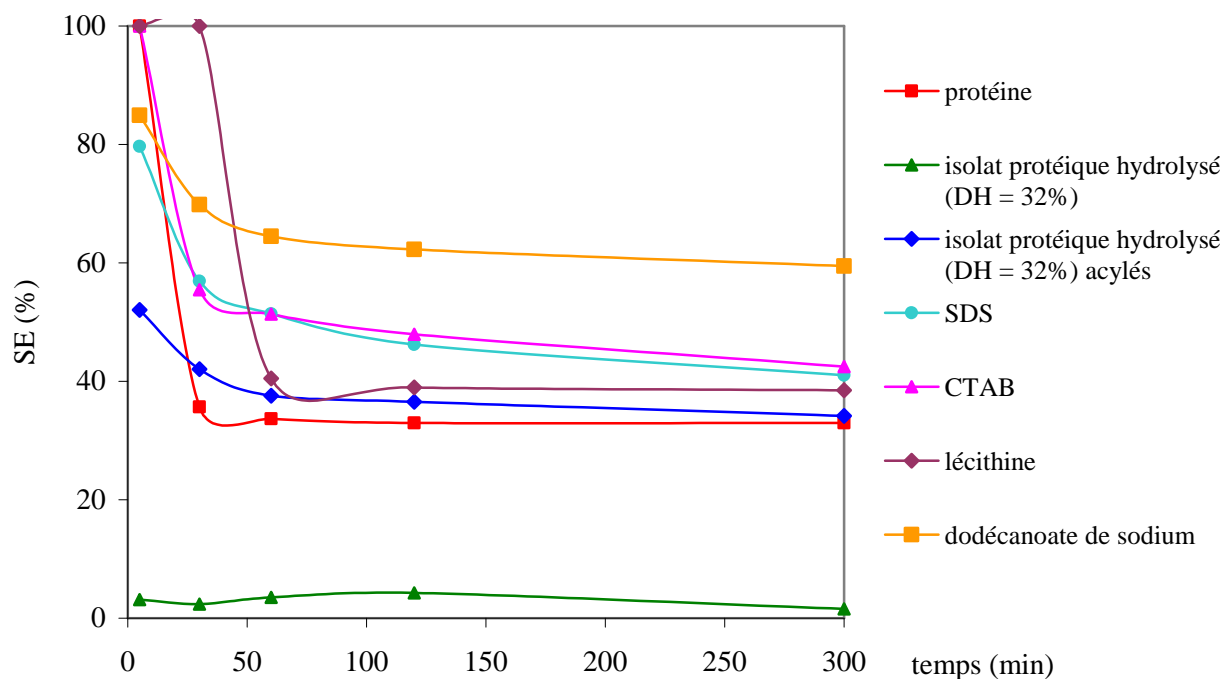


Figure IV-26 : Stabilité émulsionnante (SE) d'émulsions formées à partir de mélanges obtenus à partir des protéines de pois et de tensioactifs commerciaux

La stabilité émulsionnante des formulations à base d'hydrolysats protéiques acylés et lyophilisés est comparable avant et après dialyse (Figure IV-27).

La dialyse n'est donc pas indispensable si l'on vise des applications dans les domaines des agents émulsionnants et si on ne souhaite pas éliminer les sels inorganiques.

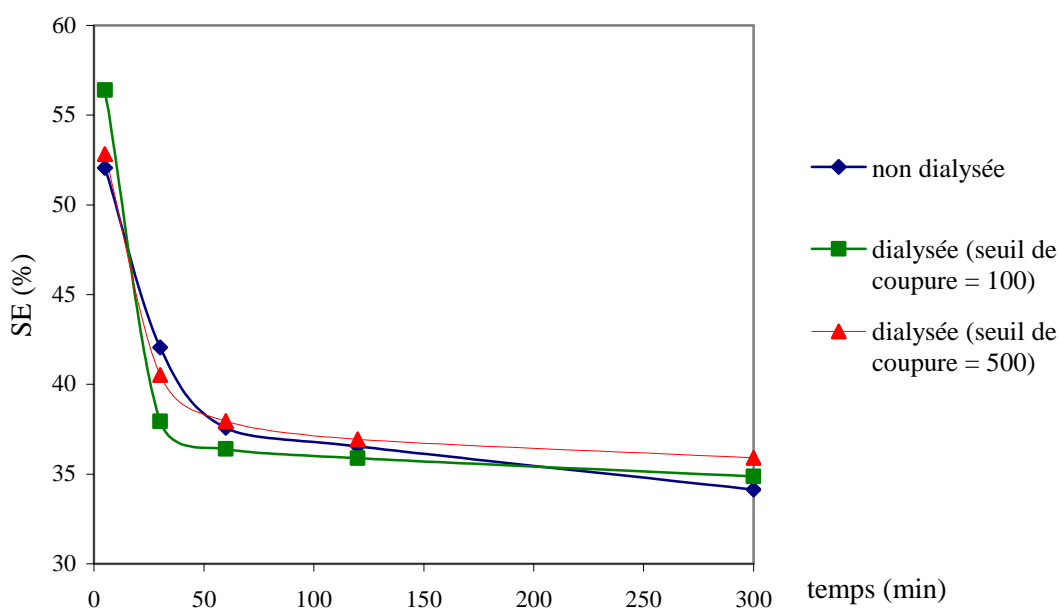


Figure IV-27 : Stabilité émulsionnante (SE) des émulsions obtenues à partir de formulations d'hydrolysats protéiques (DH = 32%) acylés, dialysés ou non et lyophilisés

#### IV.3.2.4. Conclusion

Les formulations anioniques obtenues à partir de la *N*-acylation des hydrolysats protéiques avec une chaîne lipophile en C12 possèdent une bonne activité de surface. Avec une CMC de 75 mg/L et une tension de surface de 28,4 mN/m, elles sont d'excellents agents tensioactifs. Ces mélanges peuvent être dialysés, en particulier s'ils sont utilisés comme agents émulsionnants ou moussants. Mais la dialyse entraîne une perte importante de composés amphiphiles. Il serait donc intéressant de mettre au point et d'utiliser une autre technique de séparation qui permettrait d'éliminer de manière sélective les sels inorganiques, telle que, par exemple, la chromatographie préparative d'échanges d'ions.

### IV.4. Conclusion générale

Après une mise au point sur des acides aminés modèles, au cours de laquelle une étude par spectrométrie RMN nous a permis de déterminer la composition de nos mélanges et de caractériser les constituants qui les composent, la *N*-acylation des hydrolysats

**protéiques en présence de chlorure de dodécanoyle, dans l'eau, a pu être réalisée avec un taux de conversion des fonctions amines qui atteint 83%.**

**Les formulations de tensioactifs ainsi obtenues à partir d'acides aminés et d'hydrolysats protéiques possèdent une activité de surface élevée.** En effet, les formulations binaires à base d'acides *N*<sup>α</sup>-acylaminés ont des CMC qui atteignent, par exemple, 310 mg/L pour le mélange de sels de sodium de *N*<sup>α</sup>-dodécylleucine/dodécanoate de sodium, avec une tension de surface de 30,1 mN/m. Avec les hydrolysats protéiques, on obtient des formulations ayant une CMC de l'ordre de 75 mg/L, soit une concentration trois fois inférieure à celle du SDS, avec une tension de surface de 28,4 mN/m, contre 39,1 mN/m pour ce dernier. De plus, ces formulations possèdent des propriétés moussantes et émulsifiantes équivalentes voire supérieures à celles de tensioactifs pétrochimiques commerciaux. De telles propriétés sont particulièrement recherchées dans les domaines de la détergence, de la cosmétique... **Ainsi, ces formulations, obtenues à partir de ressources naturelles renouvelables et de réactions respectueuses de l'environnement, pourraient, pour certaines applications, remplacer les tensioactifs pétrochimiques.**

L'évaluation du paramètre  $\beta$  des mélanges tensioactifs binaires obtenus avec les acides aminés modèle, ainsi que l'étude de ces systèmes (organisation des micelles, structures des émulsions et des mousses...) ainsi qu'une étude de l'influence de la structure des acides aminés *N*-acylés sur les propriétés tensioactives permettraient une meilleure compréhension de ces derniers. Nous n'avons pas abordé ces approches car nous avons fait le choix de poursuivre la fonctionnalisation des tensioactifs et de développer une nouvelle famille de tensioactifs cationiques.

**L'étape suivante consiste maintenant à étudier la réactivité de ces mélanges de tensioactifs anioniques en présence de molécules possédant une charge positive et de proposer de nouvelles formulations de tensioactifs cationiques, permettant ainsi d'élargir la gamme des applications potentielles et de répondre à une demande académique et industrielle forte. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.**

## BIBLIOGRAPHIE

Basheva E.S., Ganchev D., Denkov N.D., Kasuga K., Satoh N. and Tsujii K. (2000) Role of Betaine as Foam Booster in the Presence of Silicone Oil Drops. *Langmuir*. 16(3):1000.

Benoit J.P. and Bac E. (1999) Hair and/or body hygienic powder comprising surfactants. Patent N° WO9927899.

Ellenbogen E. (1956) The effect of optical configuration of amino acid residues on the physical properties of peptides. *Journal of Cellular Physiology. Supplement*. 47(Suppl 1):151.

Franses E.I., Prosser A.J., Infante M.R., Perez L. and A. P. (2004) Adsorption and surface tension behavior of gemini surfactants at air-water, oil-water, and solid-water interfaces. *Surfactant Science Series*. 117(Gemini Surfactants):65.

Garti N. (2001) Food emulsifier and stabilizers. In *Food shelf life stability*. N. A. M. Eskin and D. S. Robinson, Eds. CRC Press LLC: Boca Raton, p 211.

Geiger R. and Köning W. (1981) Amine protecting groups. In *The peptides*. E. Gross and J. Meienhofer, Eds. Academic Press: London, Vol. 3.

George A., Modi J., Jain N. and Bahadur P. (1998) A comparative study on the surface activity and micellar behavior of some N-acylamino acid based surfactants. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical & Analytical Chemistry*. 37A(11):985.

Godtfredsen S.E. and Bjoerkling F. (1990) An enzyme-catalyzed process for preparing N-acyl amino acids and N-acyl amino acid amides. Patent N° DK9014429.

Guéguen J. (1990) Relations entre propriétés physicochimiques et propriétés tensioactives des globulines végétales. Nantes, Université de Nantes. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences: 180.

Horiuchi T., Fukushima D., Sugimoto H. and Hattori T. (1978) Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability. *Food Chemistry*. 3(1):35.

Jungermann E., Gerecht J.F. and Krems I.J. (1956) The preparation of long chain N-acylamino acids. *Journal of the American Chemical Society*. 78:172.

Kester E.B. (1949) N-acylated derivatives of glutamic acid and process for preparing them. Patent N° US2463779.

Larre C., Mulder W., Sanchez-Vioque R., Lazko J., Berot S., Gueguen J. and Popineau Y. (2006) Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*. 49(1):40.

Nickel D., Förster T. and Von Rybinski W. (1997) Physicochemical properties of alkyl polyglycosides. In *Alkyl polyglycosides : technology, properties and applications*. K. Hill, W. Von Rybinski and G. Stoll, Eds. pp 39-70.



Oshimura E., Yamashita Y. and Sakamoto K. (2007) Conformational behavior of N-acylamino acid oil and N-acylamino acid surfactant in aqueous solution. *Journal of Oleo Science*. 56(3):115.

Paquet T. (1979) Preparation of some long-chain N-acyl derivatives of essential amino acids for nutritional studies. *Canadian Journal of Biochemistry*. 58:573.

Rosen M.J. (1991) Synergism in mixtures containing zwitterionic surfactants. *Langmuir*. 7(5):885.

Rosen M.J. and Zhu B.Y. (1984) Synergism in binary mixtures of surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 99(2):427.

Sanchez-Vioque R., Bagger C.L., Larre C. and Gueguen J. (2004) Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 271(1):220.

Sanchez-Vioque R., Bagger C.L., Rabiller C. and Gueguen J. (2001) Foaming Properties of Acylated Rapeseed (*Brassica napus* L.) Hydrolysates. *Journal of Colloid and Interface Science*. 244(2):386.

Takehara M., Yoshimura I., Takizawa K. and Yoshida R. (1972) Surface-active N-acylglutamate. I. Preparation of long-chain N-acylglutamic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 49(3):157.

Takehara M., Yoshimura I. and Yoshida R. (1974) Surface-active N-acylglutamate. IV. Physicochemical properties of triethanolamine long chain N-acylglutamates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 51(9):419.

Weiss B. (1959) Synthesis of Long Chain Fatty Acid Amides of Amino Acids. *Journal of Organic Chemistry*. 24:1367.

Xia J., Nnanna I.A. and Sakamoto K. (1998) Amino acid surfactants: chemistry, synthesis, and properties.

Xia J., Qian J. and Nnanna I.A. (1996) Synthesis and Surface Properties of Amino Acid Surfactants from Industrial Waste Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(4):975.



**CHAPITRE V :**  
**CATIONISATION DES**  
**TENSIOACTIFS**  
**ANIONIQUES : GREFFAGE**  
**D'UN AMMONIUM**  
**QUATERNAIRE SUR LES**  
**FONCTIONS**  
**CARBOXYLATES**

**CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES :**  
**GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS**  
**CARBOXYLATES.....- 178 -**

**V.1. INTRODUCTION..... - 178 -**

**V.2. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE ..... - 180 -**

V.2.1. INTRODUCTION ..... - 180 -

V.2.2. UTILISATION DU CHLORURE DE CHOLINE..... - 181 -

V.2.3. UTILISATION DU CHLORURE DU GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM ..... - 182 -

V.2.4. UTILISATION DU CHLORURE DE 3-HALO-2-HYDROXYPROPYLTRIALKYL-AMMONIUM - 184 -

**V.3. GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES DE  
MOLECULES MODELES..... - 184 -**

V.3.1. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ESTERIFICATION DE L'ACIDE DODECANOÏQUE AVEC LA  
CHOLINE ..... - 184 -

V.3.1.1. Estérification selon les travaux de Takayanagi and Endo..... - 186 -

V.3.1.2. Estérification selon les travaux de Bergfeld and al. .... - 187 -

V.3.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub>..... - 187 -

V.3.1.4. Conclusion ..... - 187 -

V.3.2. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ESTERIFICATION DE L'ACIDE DODECANOÏQUE AVEC LE  
CHLORURE DE GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM ..... - 188 -

V.3.2.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction en spectroscopie IR et RMN .. - 189 -

V.3.2.2. Résultats et discussion ..... - 192 -

V.3.2.2.1. Influence du mode d'introduction du GTA ..... - 192 -

V.3.2.2.2. Influence de la présence de catalyseur ..... - 193 -

V.3.2.2.3. Influence de la quantité de GTA ..... - 193 -

V.3.2.2.4. Influence du temps de réaction..... - 194 -

V.3.2.2.5. Influence de la nature du solvant..... - 194 -

V.3.3. RESULTATS ET DISCUSSION DE LA CATIONISATION DE L'ACIDE *N*-ACETYLGLUTAMIQUE  
AVEC LE CHLORURE DE GLYCIDYLTRIMETHYLAMMONIUM ..... - 195 -

V.3.3.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction par spectrométrie IR et RMN. - 197 -

V.3.3.2. Résultats et discussion des synthèses ..... - 200 -

V.3.3.3. Conclusion ..... - 202 -

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

---

<b>V.4. LA CATIONISATION DES FORMULATIONS DE TENSIOACTIFS ANIONIQUES ISSUES DES PROTEINES DE POIS .....</b>	<b>- 203 -</b>
V.4.1. DEMARCHE EXPERIMENTALE .....	- 203 -
V.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION .....	- 204 -
V.4.3. CONCLUSION .....	- 209 -
<b>V.5. PROPRIETES TENSIOACTIVES DES FORMULATIONS OBTENUES APRES CATIONISATION....</b>	<b>- 210 -</b>
V.5.1. TENSION DE SURFACE ET CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE .....	- 210 -
V.5.2. PROPRIETES MOUSSANTES .....	- 211 -
V.5.3. PROPRIETES EMULSIFIANTES .....	- 213 -
<b>V.6. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>- 215 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>- 218 -</b>

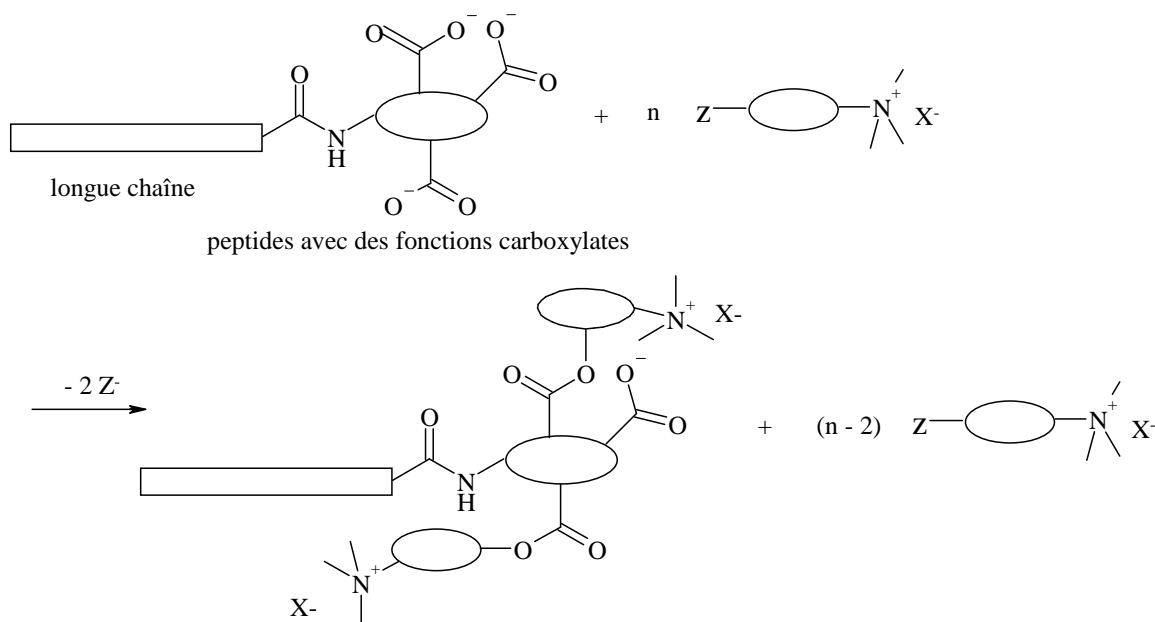
## **CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES**

### **V.1. Introduction**

Nous souhaitons synthétiser une nouvelle gamme de tensioactifs, à partir des formulations des molécules anioniques amphiphiles, obtenues dans le chapitre précédent. Pour cela, il est nécessaire de modifier la nature des têtes hydrophiles anioniques en les convertissant en cations, pour obtenir des tensioactifs cationiques.

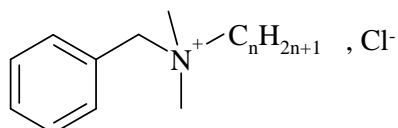
La cationisation des formulations anioniques n'est pas aisée de par la complexité des mélanges dont la composition n'a pas été précisément établie et qui constituent donc une « boîte noire ». La stratégie envisagée consiste à greffer une petite molécule possédant une double fonctionnalité : une fonction ammonium quaternaire et une fonction réactive permettant le greffage sur les fonctions carboxylates (Figure V-1). Le résultat attendu est l'obtention des tensioactifs avec un groupe fonctionnel ammonium quaternaire.

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES



**Figure V-1 : Greffage d'un ammonium quaternaire sur les fonctions carboxylates d'un sel de sodium d'un  $N^{\alpha}$ -dodécylpeptide**

Les tensioactifs possédant un ammonium quaternaire comme partie hydrophile possèdent des propriétés antimicrobiennes recherchées dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques (Carmona-Ribeiro and al. 2006). En effet, **les sels d'ammonium quaternaire ont une activité bactéricide reconnue depuis longtemps**. En 1935, l'efficacité du chlorure de benzalkonium (Figure V-2) est constatée (Rouanet and Blet 1972). Cette propriété pourrait être due à l'adsorption de sels d'ammonium quaternaire sur la paroi cellulaire, ralentissant ainsi les échanges entre la cellule et le milieu externe. Depuis, il a été démontré que de nombreux dérivés cationiques possédaient un pouvoir biocide, comme par exemple, les sels d'amine, les bétaines, etc... Ils représentent donc une classe de tensioactifs très intéressante.



**Figure V-2 : Structure du chlorure de benzalkonium**

**Pour obtenir un mélange de tensioactifs cationiques à partir de la formulation obtenue au chapitre IV, il est nécessaire que la conversion des groupes carboxylates soit supérieure à 50%.** La première étape a consisté à sélectionner les molécules bifonctionnelles pouvant répondre favorablement à notre problématique. Nous avons donc réalisé une recherche bibliographique sur ce sujet. Dans un second temps, nous avons mis au point la réaction de greffage. Nous avons tout d'abord travaillé sur des molécules modèles afin de déterminer les rendements des synthèses et d'étudier la réactivité entre les fonctions carboxylates des tensioactifs et la fonction réactive des molécules bifonctionnelles. A la suite de la mise au point de cette réaction de cationisation, nous l'avons transposée aux mélanges à base de sels de sodium de peptides *N*-acylés et de dodécanoate de sodium.

## V.2. Recherche bibliographique

### V.2.1. Introduction

Dans la littérature, peu de molécules remplissent les différents critères. Nous avons rencontré trois molécules bifonctionnelles, possédant un ammonium quaternaire et une fonction réactive susceptible de réagir avec un acide carboxylique, utilisées pour cationiser des molécules : le chlorure de choline, avec une fonction réactive alcool, les chlorures de glycidyltrialkylammonium, avec une fonction réactive époxyde et le chlorure de 3-halo-2-hydroxypropyltrialkylammonium, avec une fonction réactive halogène. La choline est un composé non toxique, contrairement aux chlorures de glycidyltrialkylammonium qui présentent une certaine toxicité, en raison de la présence de la fonction époxyde. Toutefois, cette fonction n'est plus présente, dans la formulation finale, car la fonction époxyde est ouverte lors de la réaction de greffage. **Le diol vicinal, issu de cette ouverture, est un composé non toxique rencontré dans des formulations cosmétiques, pour ces propriétés adoucissantes et hydratantes** (Hardling and Harichian 2006; Deavenport and al. 2007; Harichian and al. 2008).



### V.2.2. Utilisation du chlorure de choline

La choline est une molécule polyfonctionnelle constituée d'un groupement ammonium quaternaire, qui apporte la charge positive et d'un groupement hydroxyle. Ce centre fonctionnel permet de réaliser une réaction d'estérification (Figure V-3).

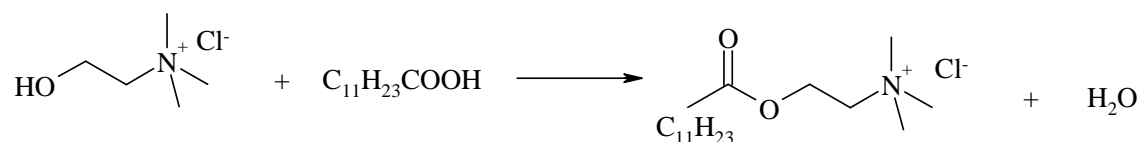


Figure V-3 : Estérification de l'acide dodécanoïque avec la choline

Toutefois, cette réaction simple est le siège de nombreuses réactions secondaires. En effet, lors de l'estérification la *O*-alkylation peut être accompagnée de la déalkylation du composé ammonium et de l'élimination d'Hofmann. En effet, les sels d'ammonium quaternaires ne sont pas stables à des températures supérieures à 100-150°C (Landini and al. 1986).

Lors du chauffage, le chlorure de choline se dégrade en *N,N*-diméthylaminoéthanol et en chlorure de méthyle (Figure V-4) (Ullmann 1986). Il peut également se produire une réaction d'élimination d'Hofmann (Ryzhkov 1994).

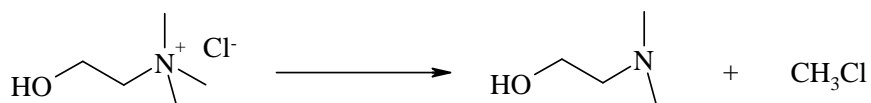
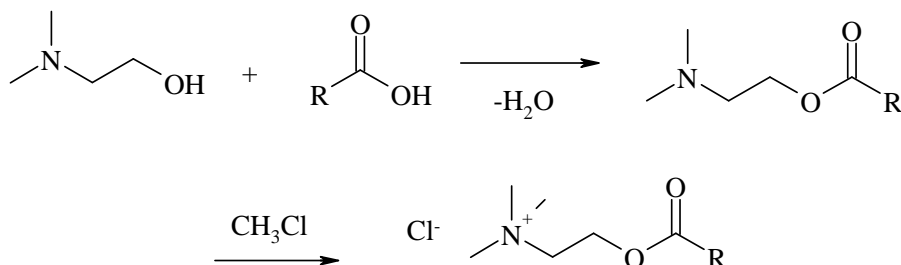


Figure V-4 : Désalkylation du chlorure de choline

La synthèse industrielle d'esters à partir de choline n'est donc pas performante via une estérification directe de la choline avec des acides carboxyliques. Une des solutions proposées est de réaliser une synthèse en deux étapes (Fuxi and al. 1993). La première consiste à faire réagir du *N,N*-diméthylaminoéthanol sur l'acide gras. Puis, lors de la seconde étape, l'amine tertiaire est quaternisée à l'aide de chlorure de méthyle ou de sulfate de méthyle. Mais cette

synthèse requiert des réactifs toxiques et conduit également à la méthylation du solvant. Cette réaction a souvent lieu dans un solvant polaire tel que l'isopropanol (Steichen 2002).



**Figure V-5 : Synthèse, en deux étapes, d'esters d'ammonium quaternaire, à partir du *N,N*-diméthylaminoéthanol (Fuxi and al. 1993)**

Takayanagi et Endo réalisent l'estérification d'acide gras avec la choline, en une seule étape, en présence d'acide phosphorique, dans du toluène (Takayanagi and Endo 1994). Ils obtiennent jusqu'à 44% de rendement.

Une autre alternative est proposée par Bergfeld and al. (Bergfeld and al. 1997). Ils réalisent l'estérification en une étape de l'acide dodécanoïque avec la choline pour former un ester d'ammonium quaternaire (ester quat). 5 équivalents d'acide dodécanoïque pour un équivalent de choline sont mis en présence à 160°C, sous pression réduite (15 à 30 mbar), avec de l'acide phosphorique, pendant 4 heures. L'acide dodécanoïque est à la fois réactif et solvant. Ils obtiennent des rendements supérieurs à 90% par rapport à la choline.

### V.2.3. Utilisation du chlorure du glycidyltriméthylammonium

De par la présence de ses fonctions époxyde réactive et ammonium quaternaire, le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA) est utilisé pour la cationisation de polymères naturels. Ainsi, des dérivés cationiques d'amidon contenant des groupes ammoniums quaternaires, avec un degré de substitution important, sont préparés par réaction d'éthérification de l'amidon avec du GTA, en solution d'hydroxyde de sodium à 5% (Bendoraitiène and al. 2006).

Des polymères possédant des fonctions amines sont également cationisés par le GTA en excès, dans l'eau. Ainsi, le GTA est greffé sur le chitosane, avec des taux de substitution atteignant 115% (déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ), après 24 h de réaction, à 70°C, pH 7 (Kim and al. 2003). Cette valeur supérieure à 100% indique que le groupe époxyde du GTA réagit également avec les groupes hydroxyles du chitosane. Des hydrolysats de protéines sont aussi cationisés à l'aide du GTA : des hydrolysats partiels de protéines de soja, à 45°C, pH 7,2, pendant 12 h (Jawed and Manian 2002) ; des hydrolysats totaux de gluten, entre 30 et 70°C, pendant 1 à 6 h (Shiyu and al. 2008) et des hydrolysats de protéines de collagène (Kahre and al. 2003). Les hydrolysats de collagène sont aussi cationisés par le chlorure de glycidyl-lauryl-dialkylammonium pour former un ester d'ammonium commercialisé sous le nom « Lamequat®L », par Chemische Fabrik Grünau. Pour ces réactions d'amidation, les rendements obtenus ne sont pas indiqués.

Le GTA réagit donc sur des fonctions amines et hydroxyles, dans l'eau. Il s'avère que notre objectif est de réaliser le greffage sur les fonctions carboxylates de nos tensioactifs anioniques, afin de les cationiser. **Une telle réaction a été uniquement décrite sur des acides gras, dans un brevet l'Oréal, comme procédé de préparation de dérivés d'ammonium quaternaire, pour une utilisation en cosmétique** (Philippe and Campos 1998). Ce procédé en une seule étape consiste à faire réagir, dans le butan-2-ol, un acide carboxylique aliphatique, en catalyse basique, avec le GTA. Cette réaction ne peut s'effectuer dans l'eau, car les molécules d'eau sont plus réactives que les fonctions carboxyliques vis-à-vis du groupe époxyde du GTA, provoquant son hydrolyse. Cette réaction endothermique, réalisée à reflux du butan-2-ol, pendant 6 h après l'introduction goutte à goutte du GTA, est catalysée par l'hydrogénocarbonate de sodium qui rend le milieu faiblement basique, permettant la formation du dodécanoate de sodium et l'attaque nucléophile de l'oxygène sur le carbone le moins encombré de la fonction époxyde. Cette réaction conduit à la formation d'un hydroxyester (Figure V-6).

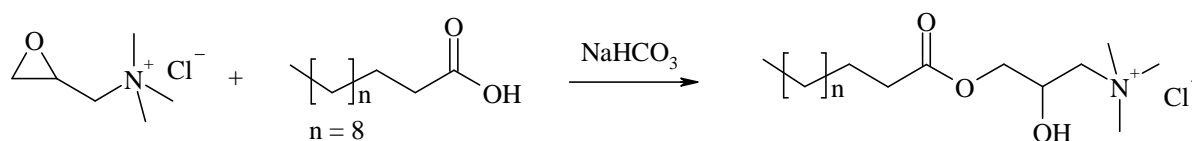


Figure V-6 : Estérification de l'acide dodécanoïque avec le GTA

Le GTA sera donc une molécule intéressante pour cationiser les formulations de tensioactifs anioniques précédemment obtenues.

#### **V.2.4. Utilisation du chlorure de 3-halo-2-hydroxypropyltrialkyl-ammonium**

Le chlorure de 3-halo-2-hydroxypropyltrialkyl-ammonium, commercialisé sous le nom « Dow Quat 188 », par Dow Chemical Company, est également rencontré de façon plus marginale que le GTA, pour la cationisation d'hydrolysats de protéines (Jawed and Manian 2002; Kahre and al. 2003; Cassier and Schreiber 2006). Il est utilisé dans des conditions similaires à celles du GTA (Jawed and Manian 2002).

### **V.3. Greffage d'un ammonium quaternaire sur les fonctions carboxylates de molécules modèles**

Les deux molécules modèles utilisées pour la mise au point de la réaction de cationisation sont l'acide dodécanoïque et l'acide *N*-acétylglutamique. En effet, l'acide dodécanoïque sous sa forme basique est une molécule amphiphile qui possède un groupement carboxylate. De plus, il est présent à plus de 40% dans les formulations tensioactives précédemment obtenues. Quant à l'acide *N*-acétylglutamique, sous sa forme basique, c'est un homologue commercial du *N*-dodécylglutamate de sodium. Il possède deux fonctions carboxylates, tout comme le glutamate et l'aspartate de sodium, acides aminés présents en quantité importante dans les peptides *N*-acylés. Sa fonction amine est protégée par un groupement acétyl, ce qui la rend non réactive, comme dans les peptides *N*-acylés.

#### **V.3.1. Résultats et discussion de l'estérification de l'acide dodécanoïque avec la choline**

Lors d'une première étape, deux séries d'expériences ont été réalisées selon les protocoles opératoires décrits par Takayanagi and Endo, d'une part, et par Bergfeld and al., d'autre part.

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

La présence de la fonction ester est évaluée, en amont de tout autre analyse, par spectrométrie IR. La présence de la bande d'élongation  $\nu_{C=O}$ , caractéristique de l'ester, à  $1741\text{ cm}^{-1}$ , et la diminution de la bande d'élongation  $\nu_{C=O}$  acide, à  $1710\text{ cm}^{-1}$ , permettent de confirmer la formation de l'ester.

Les rendements des réactions d'estérification sont déterminés par RMN  $^1\text{H}$ . L'étude préliminaire des signaux  $^1\text{H}$  (zgpr) et  $^{13}\text{C}$  (zgif et zgpg30) a conduit à l'attribution des signaux. Les déplacements chimiques des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  sont présentés dans le Tableau V-1 et le Tableau V-2, respectivement.

chlorure de choline		(D <sub>2</sub> O) 54,00 (3) ; 55,80 (1) ; 67,60 (2)
acide dodécanoïque		(DMSO) 14,13 (1) ; 22,16 à 31,99 (2) ; 24,75 (3) ; 34,21 (4) ; 180,74 (5)

**Tableau V-1 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  (75,5 MHz; Me<sub>4</sub>Si), des réactifs de la réaction d'estérification**

chlorure de choline		(D <sub>2</sub> O) 3,16 (9 H, s, 3) ; 3,46 à 3,50 (2 H, m, 2) ; 4,00 à 4,05 (1 H, t, 1)
acide dodécanoïque		(DMSO) 0,79 (3 H, t, 1) ; 1,18 (16 H, s, 2) ; 1,40 à 1,44 (2 H, m, 3) ; 2,13 (2 H, t, 4) ; 11,81 (1 H, s, 5)
ester d'ammonium quaternaire		(DMSO) 0,85 (3 H, t, 1) ; 1,23 (16 H, s, 2) ; 1,52 à 1,62 (2 H, m, 3) ; 2,22 (2 H, t, 4) ; 3,12 (9 H, s, 7) ; 3,23 (2 H, t, 5) ; 4,15 (2 H, t, 5)

**Tableau V-2 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (300,1 MHz; Me<sub>4</sub>Si) ; des réactifs et du produit de la réaction d'estérification**

Les valeurs d'intégration des spectres  $^1\text{H}$  sont déterminées pour permettre le dosage de la teneur en ester produit par rapport à l'acide dodécanoïque réactif. Les intégrales choisies ( $I_\alpha$  et  $I_\beta$ ) correspondent au  $\text{CH}_2$  en bêta de la fonction ammonium quaternaire de l'ester d'ammonium quaternaire (H 5, Tableau V-2) (intégrale  $I_\beta$ ) et au  $\text{CH}_2$  en alpha de la fonction acide carboxylique de l'acide dodécanoïque (H 4, Tableau V-2) (intégrale  $I_\alpha$ ). Le dosage des mélanges permet le calcul du rendement de la réaction d'estérification ( $R_E$ ) suivant la formule :

$$R_E = \frac{I_\beta}{I_\alpha + I_\beta} \times 100 \quad \text{Équation V-1}$$

$I_\beta$  : valeur de l'intégrale correspondant à un proton H 5 de l'ester d'ammonium quaternaire

$I_\alpha$  : valeur de l'intégrale correspondant à un proton H 4 de l'acide dodécanoïque

#### V.3.1.1. Estérification selon les travaux de Takayanagi and Endo

La première série d'expériences est réalisée, à pression atmosphérique, avec un catalyseur acide, l'acide phosphorique, dans un solvant organique (acétone, acétate d'éthyle ou toluène), à reflux du solvant (voir conditions expérimentales chapitre II, paragraphe II.3.3.1.1.1.).

L'acide phosphorique présente de nombreux avantages : peu oxydant par rapport à l'acide sulfurique, moins dangereux à manipuler et peu toxique par rapport aux catalyseurs organométalliques. Dans le cas de son élimination sous forme de sel, il est recyclable en tant qu'engrais.

Un Dean Stark rempli de tamis moléculaire permet d'éliminer l'eau formée et de déplacer l'équilibre de la réaction. Pour chaque solvant étudié, on obtient deux phases en fin de réaction : une phase solide, insoluble dans le solvant organique et une phase liquide, soluble. Les synthèses réalisées dans l'acétone ne conduisent pas à la formation de produit, en raison de sa faible température d'ébullition, qui limite la température de réaction à  $56^\circ\text{C}$ . L'apport d'énergie n'est donc pas suffisant pour activer la réaction. De plus, l'acétone est miscible à l'eau, ce qui limite l'élimination de celle-ci. Lors de la mise en œuvre des réactions d'estérification avec l'acétate d'éthyle, la formation d'acide acétique est observée (odeur piquante caractéristique). Seul 6% de produit est formé. Les meilleurs rendements sont obtenus avec le toluène ( $R_E = 17\%$ ), mais ils restent largement insuffisants.

#### **V.3.1.2. Estérification selon les travaux de Bergfeld and al.**

La deuxième série d'expériences, inspirée du brevet de Bergfeld and al. (Bergfeld and al. 1997), est réalisée, sans solvant, avec un excès d'acide gras, sous vide (30 mbar), à 160°C (voir conditions expérimentales chapitre II, paragraphe II.3.3.1.1.2.). A la fin de la réaction, on obtient deux phases non miscibles qui sont analysées en spectroscopie IR et RMN. La phase supérieure est constituée uniquement d'acide dodécanoïque et la phase inférieure de choline. L'ester d'ammonium quaternaire n'est donc pas formé contrairement aux résultats décrits par Bergfeld and al.

Le principal problème de l'estérification avec l'acide dodécanoïque et la choline est la mise en contact des deux réactifs. A la fin des réactions, on observe systématiquement deux phases non miscibles, contenant chacune un des réactifs. En effet, l'acide dodécanoïque est soluble dans les solvants organiques, alors que la choline est soluble dans l'eau. Pour palier à ce problème de solubilité des réactifs, nous avons envisagé, dans une troisième étape, de réaliser la synthèse dans un liquide ionique à base de choline, le chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub>, en nous inspirant des travaux de Sunitha and al. (Sunitha and al. 2007).

#### **V.3.1.3. Estérification dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub>**

Le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub> est utilisé comme solvant lors de l'estérification d'acide gras (de 8 à 22 atomes de carbone) avec des alcools gras (de 8 à 22 atomes de carbone), avec des rendements qui atteignent 99% (Sunitha and al. 2007). Les réactions ont lieu à 110°C, pendant 4 à 24 h, selon les réactifs mis en jeu.

Des réactions analogues ont donc été réalisées avec l'acide dodécanoïque et la choline dans le liquide ionique chlorure de choline·2ZnCl<sub>2</sub>. Les spectres infrarouges des produits ainsi obtenus ne présentent pas de bande ester. Le produit n'a donc pas été formé.

#### **V.3.1.4. Conclusion**

**Les différentes réactions d'estérification mises en oeuvre avec la choline et l'acide dodécanoïque donnent des rendements très faibles voir nuls.** Seules les réactions dans l'acétate d'éthyle et le toluène, en présence d'acide phosphorique, permettent l'obtention

d'une faible proportion d'ester d'ammonium quaternaire ( $R_E = 6$  et  $17\%$ , respectivement). **La fonction hydroxyle de la choline est fortement désactivée par l'effet attracteur de l'ammonium quaternaire. A cela s'ajoute sa dégradation lorsque la température de réaction est élevée. Ces deux phénomènes rendent l'estérification de la choline, par une fonction carboxylique non activée, très difficile.** Etant donné que nous n'envisageons pas l'activation des fonctions acides carboxyliques par la formation d'un chlorure d'acide ou l'utilisation du dicyclohexylcarbodiimide, **nous devons avoir recours à un autre réactif possédant une fonction, greffable sur les groupements carboxylates, plus réactive et une fonction ammonium quaternaire qui apporte la charge positive.** Le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA) est un ammonium quaternaire qui possède une fonction époxyde réactive. Il peut donc représenter une alternative intéressante.

### V.3.2. Résultats et discussion de l'estérification de l'acide dodécanoïque avec le chlorure de glycidyltriméthylammonium

Nous nous sommes inspirés des conditions opératoires décrites par Philippe and Campos (1998) (Figure V-7) et nous avons optimisé le taux de conversion de la réaction d'estérification. Pour cela, nous avons étudié l'influence de différents paramètres, tels que le temps de réaction, la quantité de catalyseur, la quantité et le mode d'introduction du GTA et la nature du solvant. Pour déterminer le taux de conversion de la réaction d'estérification, il a été nécessaire de mettre au point une méthode d'analyse quantitative des mélanges obtenus, par spectrométrie RMN.

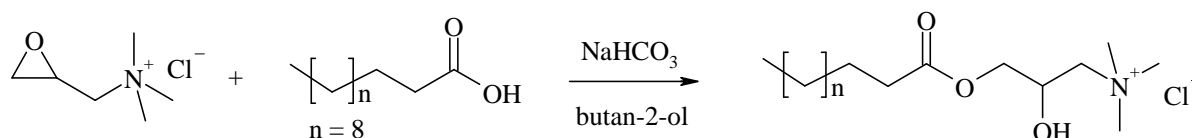


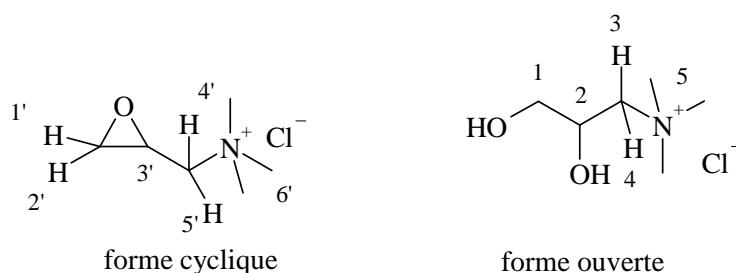
Figure V-7 : Estérification de l'acide dodécanoïque en présence de GTA



### V.3.2.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction en spectroscopie IR et RMN

La présence de la fonction ester est évaluée, en amont de tout autre analyse, par spectrométrie IR. La présence de la bande d'élongation  $\nu_{C=O}$ , caractéristique de l'ester, à  $1744\text{ cm}^{-1}$ , et la diminution de la bande d'élongation  $\nu_{C=O}$  acide, à  $1710\text{ cm}^{-1}$ , permettent de confirmer la formation de l'ester.

Les rendements des synthèses sont déterminés par RMN. L'étude préliminaire des signaux  $^1\text{H}$  (zgpr) et  $^{13}\text{C}$  (zgig et zgpg30) complétée de l'étude 2D (COSY, HSQC, HMBC) a conduit à l'attribution des signaux. Les déplacements chimiques des RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des réactifs et produits sont présentés dans le Tableau V-3 et le Tableau V-4. La Figure V-10 et la Figure V-11 représentent l'ester d'ammonium produit. Lors de l'estérification, une partie du GTA s'ouvre pour former un diol, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium (Figure V-8 et Figure V-9). Ce composé est présent dans les mélanges finaux. L'étude de ses signaux, en spectrométrie RMN, a donc été nécessaire.



**Figure V-8 : Représentation et nomenclature du GTA et de sa forme ouverte, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, pour les spectres RMN  $^1\text{H}$**

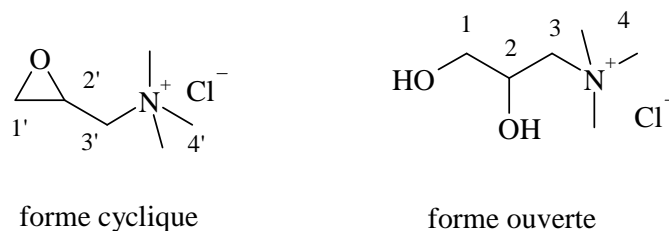


Figure V-9 : Représentation et nomenclature du GTA et de sa forme ouverte, pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$

	$\delta_{\text{C}}$ (75,5 MHz ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (300,1 MHz ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )
forme cyclique	45,02 (1') ; 45,83 (2') ; 53,89 (4') ; 68,79 (3')	2,80 (1 H, dd, 1') ; 3,10 (1 H, t, 2') ; 3,14 à 3,24 (1 H, dd, 5') ; 3,26 (9 H, s 1, 6') ; 3,57 à 3,63 (1 H, m, 3') ; 3,92 (1 H, dd, 4')
forme ouverte	54,12 (4) ; 63,58 (1) ; 66,33 (2) ; 68,05 (3)	3,03 (9 H, s 1, 5) ; 3,18 à 3,27 (2 H, m, 3 et 4) ; 3,39 (2 H, d, 1) ; 4,08 (1 H, dd, 2)

Tableau V-3 : Attribution des signaux des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  du GTA et du le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, dans  $\text{D}_2\text{O}$

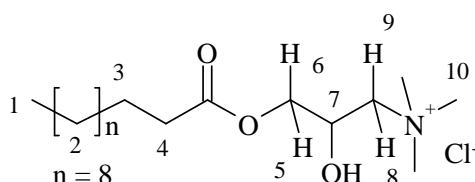


Figure V-10 : Représentation et nomenclature de l'ester d'ammonium quaternaire obtenu à partir de l'acide dodécanoïque, pour les spectres RMN  $^1\text{H}$

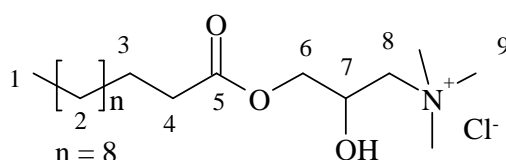


Figure V-11 : Représentation et nomenclature de l'ester d'ammonium quaternaire obtenu à partir de l'acide dodécanoïque, pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$

# CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

$\delta_C$ (75,5 MHz ; D <sub>2</sub> O ; Me <sub>4</sub> Si)	$\delta_H$ (300,1 MHz ; D <sub>2</sub> O ; Me <sub>4</sub> Si)
13,84 (1) ; 22,68 à 32,04 (2) ; 24,69 (3) ; 33,68 (4) ; 54,18 (9) ; 64,04 (7) ; 67,59 (6) ; 68,14 (8) ; 174,64 (5)	0,74 (3 H, t, 1) ; 1,15 (16 H, s l, 2) ; 1,46 (2 H, m, 3) ; 2,29 (2 H, t, 4) ; 3,12 (9 H, s l, 10) ; 3,40 à 3,45 (2 H, m, 8 et 9) ; 3,9 à 4,06 (2 H, m, 5 et 6) ; 4,39 (1 H, m, 7)

**Tableau V-4 : Attribution des signaux des spectres RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H de l'ester d'ammonium quaternaire**

On observe la présence de triplet sur le spectre <sup>13</sup>C du GTA et du chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, pour les carbones n° 1, 3 et 4, en raison d'un couplage carbone-azote. Ceci est dû à l'influence des facteurs qui gouvernent le taux de relaxation quadripolaire. Le couplage des noyaux quadripolaires qui existe dans un environnement hautement symétrique est probablement dû à la lente relaxation du noyau. Pour cette raison, le spectre du carbone du GTA à une forme inhabituelle, présentant des triplets (Günther 1995; Claridge 1999).

La réaction d'estérification entre le cycle époxyde du GTA et une fonction carboxylate conduit à la formation d'un stéréocentre (C7, Figure V-11). Les conformations des produits issus de cycle époxyde ont été déterminées et discutées dans la littérature (Prelog and Helmchen 1982; Hanson 1991). La conformation des produits obtenus n'a pas été étudiée ici.

Les valeurs d'intégration des spectres <sup>1</sup>H sont déterminées, pour permettre le dosage de la teneur en produit, par rapport à l'acide dodécanoïque. Les intégrales choisies (I<sub>r</sub> et I<sub>p</sub>) correspondent au CH<sub>2</sub> en alpha de la fonction ester (H 4, Figure V-10) (intégrale I<sub>p</sub>) et du CH<sub>2</sub> en alpha de la fonction carboxylate du dodécanoate de sodium (H 4, Tableau V-2) (intégrale I<sub>r</sub>). Le dosage des mélanges permet le calcul du rendement de la réaction d'estérification par rapport à l'acide dodécanoïque (R<sub>E</sub>), suivant la formule :

$$R_E = \frac{I_p}{I_p + I_r} \times 100 \quad \text{Équation V-2}$$

I<sub>r</sub> : valeur de l'intégrale correspondant à un proton H 4 du dodécanoate de sodium

I<sub>p</sub> : valeur de l'intégrale correspondant à un proton H 4 de l'ester d'ammonium quaternaire

### V.3.2.2. Résultats et discussion

#### V.3.2.2.1. Influence du mode d'introduction du GTA

Différentes réactions de condensation entre le GTA et l'acide dodécanoïque ont été effectuées selon le même protocole opératoire (1 éq. de dodécanoate de sodium, 0,05 éq. de  $\text{NaHCO}_3$ , introduction d'1 éq. de GTA à reflux du butan-2-ol et maintien du reflux pendant 6 h après la fin de l'ajout du GTA) à l'exception du mode d'introduction du GTA dans le milieu réactionnel. Les rendements obtenus sont présentés dans le Tableau V-5. Dans la littérature (Philippe and Campos 1998), la durée de l'introduction goutte à goutte du GTA n'est pas précisée. Nous avons réalisé des premiers essais avec une durée de 1 h, fixée arbitrairement. La durée de 3 h a été ensuite choisie afin d'allonger au maximum la durée d'introduction du GTA, tout en permettant de réaliser la synthèse sur une journée.

mode d'introduction du GTA	$R_E$ (%)
directe	61
1 h de goutte à goutte	66
3 h de goutte à goutte	68

$\text{NaHCO}_3$  : 0,05 éq ; GTA : 1 éq. ;  $T = 100^\circ\text{C}$  ;  $t = 6$  h après la fin de l'introduction du GTA ; solvant : butan-2-ol

**Tableau V-5 : Rendement de la réaction d'estérification en fonction du mode d'introduction du GTA**

Le mode d'introduction du GTA semble avoir une influence sur le rendement de la réaction d'estérification qui augmente de + 5 à + 7%, selon les conditions mises en œuvre. En effet, l'ajout progressif du GTA permet de limiter son hydrolyse. Par la suite, le GTA sera donc introduit goutte à goutte pendant 3 h.

#### V.3.2.2.2. Influence de la présence de catalyseur

La réaction d'estérification est réalisée en absence de catalyseur (expérience témoin) et en catalyse basique, en présence de quantités différentes d'hydrogénocarbonate de sodium solide (Tableau V-6).

quantité de $\text{NaHCO}_3$ (éq.)	$R_E$ (%)
0	0
0,05	68
0,1	63

GTA : 1 éq. ;  $T = 100^\circ\text{C}$  ;  $t = 3 \text{ h} + 6 \text{ h}$  ; solvant : butan-2-ol

**Tableau V-6 : Rendement de la réaction d'estérification en fonction de la quantité de  $\text{NaHCO}_3$  introduit**

La présence de l'hydrogénocarbonate de sodium est indispensable pour effectuer l'estérification. Cependant, dans les conditions opératoires utilisées, le rendement n'est pas amélioré lorsque l'on double la quantité de catalyseur. En effet, lorsqu'on introduit davantage de base, il est possible que l'on favorise, en parallèle l'ouverture du cycle époxyde du GTA et la dégradation du réactif par élimination d'Hofmann.

#### V.3.2.2.3. Influence de la quantité de GTA

L'introduction d'un excès de GTA permet une augmentation du rendement de +20% (Tableau V-7). En effet, les spectres RMN obtenus montrent qu'une partie du GTA s'hydrolyse lors de la réaction et conduit à la formation de la forme ouverte (le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium) qui n'est pas réactive, consommant ainsi le GTA qui devient alors le réactif limitant. Un excès de GTA est donc indispensable à l'obtention d'un rendement élevé. En contre partie, la présence de la forme ouverte du GTA, dans le milieu réactionnel final ne devra pas être un frein au développement des formulations envisagées. Cet aspect sera discuté plus loin dans ce chapitre (paragraphe V.5.2.)

éq. de GTA	R <sub>E</sub> (%)
1	68
1,5	88

T = 100°C ; t = 3 h + 6 h ; 0,05 éq. de NaHCO<sub>3</sub> ; solvant : butan-2-ol

**Tableau V-7 : Rendement de la réaction d'estérification en fonction de la quantité de GTA**

#### V.3.2.2.4. Influence du temps de réaction

Une série de synthèses est réalisée (Tableau V-8). Elle fixe la durée d'introduction du GTA à 3 h, puis on fait varier la durée de réaction de 2 à 6 h. L'allongement de 4 h de la durée de l'estérification ne permet pas d'accroître de façon significative le rendement. Une étude cinétique de cette réaction aurait permis de mieux connaître la réactivité du GTA sur la fonction carboxylate du dodécanoate de sodium et d'optimiser sa durée. Par manque de temps, nous n'avons pas pu réaliser cette étude.

quantité de GTA (éq.)	durée du goutte à goutte (h)	t (h)	R <sub>E</sub> (%)
1,5	3	6	88
1,5	3	2	86

T = 100°C ; 0,05 éq. de NaHCO<sub>3</sub> ; solvant : butan-2-ol

**Tableau V-8 : Rendement de la réaction d'estérification en fonction du temps de réaction**

#### V.3.2.2.5. Influence de la nature du solvant

Le choix du solvant utilisé influe de façon significative sur le rendement de la réaction d'estérification. Les réactions réalisées dans le propan-2-ol ont des rendements de 63% alors que celles réalisées dans le butan-2-ol ou le tertibutanol conduisent à des rendements de 92

et 88%, respectivement (Tableau V-9). La température de réaction ne peut être mise en cause car le tertibutanol, qui a une température d'ébullition comparable à celle du propan-2-ol, conduit à de très bons rendements. L'encombrement stérique du solvant et par la même sa réactivité potentielle pourrait être un paramètre important. La fonction alcool du propan-2-ol est moins encombrée que celles du butan-2-ol et surtout du tertibutanol, elle est donc plus réactive. Une réaction secondaire entre le propan-2-ol et le GTA pourrait expliquer cette différence de rendements. Pour tenter d'apporter une réponse, nous avons réalisé une expérience complémentaire dans les mêmes conditions opératoires en présence uniquement de propan-2-ol, de GTA et d'hydrogénocarbonate de sodium. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit obtenu montre qu'une réaction d'éthérification entre l'alcool et l'époxyde a bien eu lieu.

Toutefois, le butan-2-ol est beaucoup moins toxique que le tertibutanol (hautement inflammable et toxique par inhalation) et sera donc utilisé préférentiellement lors des synthèses ultérieures sur les peptides *N*-acylés.

solvant	T (°C)	R <sub>E</sub> (%)
butan-2-ol	100	88
tertibutanol	85	92
propan-2-ol	85	63

GTA : 1,5 éq. ; t = 3 h + 6 h ; 0,05 éq. de NaHCO<sub>3</sub>

**Tableau V-9: Rendement de la réaction d'estérification en fonction du solvant de la réaction**

### **V.3.3. Résultats et discussion de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique avec le chlorure de glycidyltriméthylammonium**

L'acide *N*-acétylglutamique est également utilisé comme modèle pour l'étude de l'estérification des fonctions carboxylates par le GTA. La protection de l'acide *N*-acétylglutamique permet l'estérification sélective des fonctions carboxylates (Figure V-12).

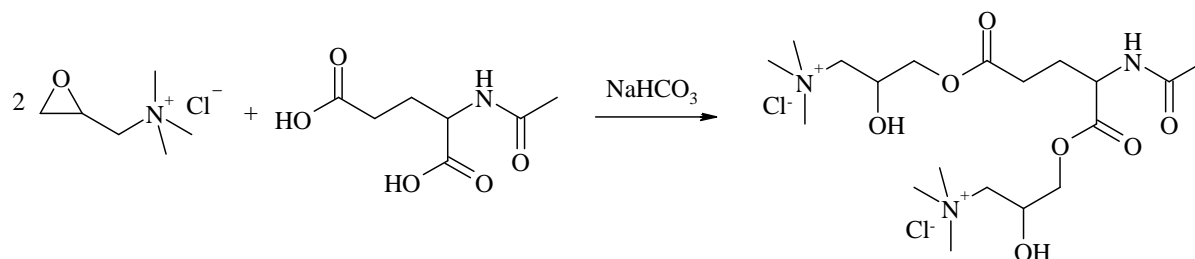


Figure V-12 : Cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique à l'aide du GTA

L'acide *N*-acétylglutamique possède deux fonctions acides carboxyliques qui ont, à priori, une réactivité assez proche. On peut donc envisager l'obtention de plusieurs produits, les deux monosubstitués et le disubstitué (Figure V-13).

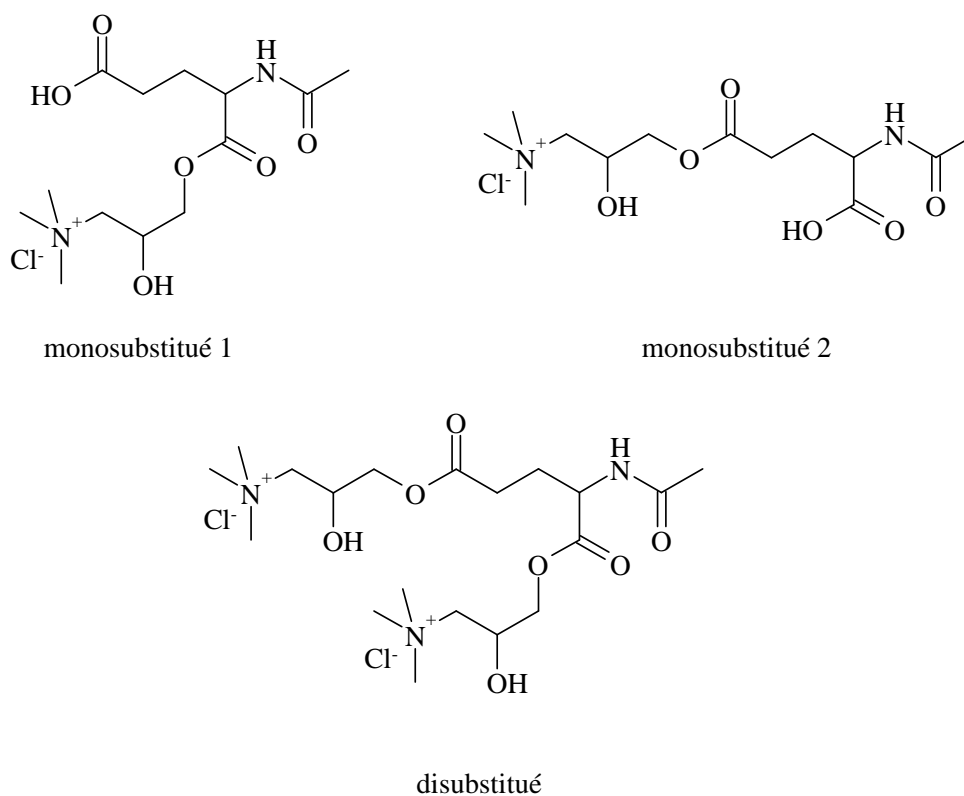


Figure V-13 : Produits attendus de la réaction d'estérification de l'acide *N*-acétylglutamique en présence de GTA



### V.3.3.1. Analyses des réactifs et produits de la réaction par spectrométrie IR et RMN

Pour la caractérisation des réactifs et produits de cette réaction, nous avons procédé selon une démarche identique à celle utilisée pour l'acide dodécanoïque, c'est-à-dire qu'avant de déterminer de manière quantitative la composition des mélanges obtenus, les produits sont analysés par spectrométrie infrarouge afin de mettre en évidence la présence des fonctions esters (bande d'élongation ester à  $1737\text{ cm}^{-1}$ ).

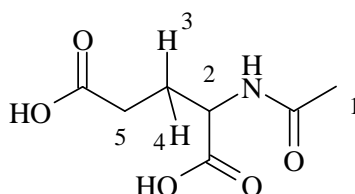
Les rendements des synthèses des différents protocoles testés sont ensuite déterminés par RMN. L'étude préliminaire des signaux  $^1\text{H}$  (zgpr) et  $^{13}\text{C}$  (zgig et zgpg30) complétée de l'étude 2D (COSY, HSQC, HMBC) a conduit à l'attribution des signaux. Les déplacements chimiques des RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de l'acide *N*-acétylglutamique sont présentés dans le Tableau V-10. L'attribution des signaux des mélanges finaux est donnée dans le Tableau V-11. Celle-ci correspond aux déplacements chimiques des produits monosubstitués, disubstitué et des réactifs. Les spectres RMN 1D et 2D, d'un mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique se trouvent en annexe (Figures A-6 à A-14).

L'attribution des signaux a été possible en croisant les informations des différents spectres 2D. Ainsi par exemple, en HMBC, le H 1 (Figure V-17) (dont le pic a été attribué grâce à l'HSQC) couple avec le C 2 (Figure V-16). L'attribution de ce dernier a ainsi pu être réalisé ( $172,62$  à  $172,74\text{ ppm}$ ). Le H 2 porté par le carbone asymétrique (dont le pic a été attribué grâce à l'HSQC) couple avec le C 2 et le C 6' en HMBC, d'où l'attribution des C 6' ( $177,13$  et  $177,19\text{ ppm}$  qui correspondent à la forme monosubstitué 1 et disubstitué) etc.

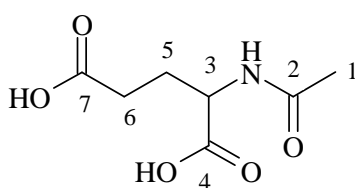
Le manque de résolution, dû à une largeur importante des tâches de réponse dans l'axe carbone des spectres 2D obtenus avec le spectromètre 300 MHz avec un nombre de scans de 1536, ne permet pas systématiquement l'attribution précise de chaque pic. En effet, les spectres présentent une multiplicité de pics qui correspondent aux quatre formes présentes dans les mélanges. Ainsi, lorsqu'il a été possible de les distinguer, les protons appartenant au *N*-acétylglutamate sont indicés par la lettre a, ceux du monosubstitué 1 par la lettre b, ceux du monosubstitué 2 par la lettre c et enfin ceux du disubstitué par la lettre d. Cependant, lorsque l'attribution précise des protons et carbones des différents composés du mélange n'a pas été possible, nous avons donné la largeur spectrale correspondant aux protons et carbones équivalents des différents composés. Ainsi par exemple pour le C 1 ( $21,95$ ,  $21,90$ ,  $21$ ,  $72$  et  $21,66\text{ ppm}$ ) et H 1 ( $1,88$ ,  $1,89$ ,  $1,91$  et  $1,92\text{ ppm}$ ) nous avons 4 couples protons carbones.

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

Cependant la résolution suivant l'axe carbone de l'HSQC, ne nous permet pas d'attribuer avec certitude ces quatre couples. Pour palier à ce problème, il faudrait réaliser les spectres sur un appareil plus puissant de 500 MHz ou augmenter le temps d'analyse, par exemple. Il en est de même pour les couples H 1 (1,88, 1,89, 1,91 et 1,92 ppm) et C 2 (172,63 à 174,72 ppm) en HMBC.



**Figure V-14 : Représentation et nomenclature de l'acide *N*-acétylglutamique pour les spectres RMN  $^1\text{H}$**



**Figure V-15 : Représentation et nomenclature de l'acide *N*-acétylglutamique pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$**

	$\delta_{\text{C}}$ (75,5 MHz ; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (300,1 MHz; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )
forme acide		1,76 à 1,89 (1H, m, 3) ; 1,86 (3 H, s, 1) ; 2,01 à 2,10 (1 H, m, 4) ; 2,30 à 2,35 (2 H, t, 5) ; 4,21 à 4,26 (1 H, dd, 2)
forme basique	22,02 (1) ; 28,3 (5) ; 34,02 (6) ; 55,27 (3) ; 173,70 (2) ; 179,11 (4) ; 182,15 (7)	1,65 à 1,82 (1H, m, 3) ; 1,86 (3 H, s, 1) ; 1,86 à 1,99 (1 H, m, 4) ; 2,14 à 2,21 (2 H, t, 5) ; 3,95 à 4,00 (1 H, dd, 2)

**Tableau V-10 : Attribution des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de l'acide *N*-acétylglutamique**

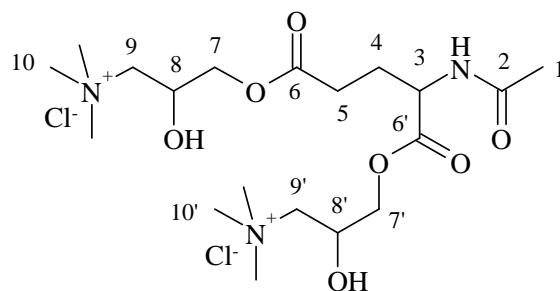


Figure V-16 : Représentation et nomenclature de l'ester d'ammonium quaternaire obtenu à partir de l'acide *N*-acétylglutamique pour les spectres RMN  $^{13}\text{C}$

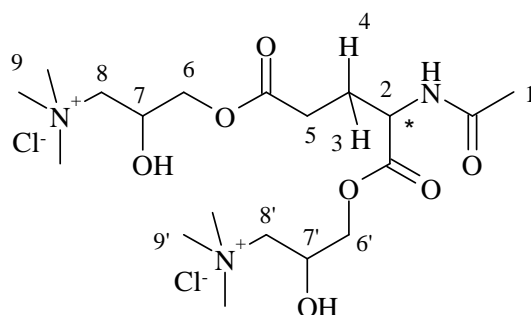


Figure V-17 : Représentation et nomenclature de l'ester d'ammonium quaternaire obtenu à partir de l'acide *N*-acétylglutamique pour les spectres RMN  $^1\text{H}$

$\delta_{\text{C}}$ (75,5 MHz ; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (300,1 MHz; $\text{D}_2\text{O}$ ; $\text{Me}_4\text{Si}$ )
21,66 à 21,95 (1) ; 53,62 à 54,28 (3) ; 25,78 (4a) ; 25,81 (4b) ; 26,43 (4c) ; 26,71 (4d) ; 29,7 (5d) ; 30,1 (5c) ; 30,6 (5b) ; 30,8 (5a) ; 54,14 à 54,25 (10 et 10') ; 63,87 à 66,56 (8 et 8') ; 66,49 à 68,32 (7 et 7') ; 67,63 (9 et 9') ; 172,63 à 174,72 (2), 177,13 et 177,19 (6'), 177,70 à 177,88 (6)	1,88 à 1,92 (3 H, s, 1) ; 1,82 (1 H, m, 4d) ; 1,89 (1 H, m, 4c) ; 1,91 (1 H, m, 4b) ; 1,94 (1 H, m, 4a) ; 2,04 (1 H, m, 3d) ; 2,09 (1 H, m, 3c) ; 2,10 (1 H, m, 3b) ; 2,15 (1 H, m, 3a) ; 2,31 (2 H, t, 5a) ; 2,36 (2 H, t, 5b) ; 2,41 (2 H, t, 5c) ; 2,48 (2 H, t, 5d) ; 3,08 à 3,11 (9 H, s, 9 et 9') ; 3,31 à 3,45 (2 H, m, 8 et 8') ; 4,01 à 4,13 (2 H, m, 6) ; 4,15 à 4,23 (1 H, dd, 2) ; 4,17 à 4,22 (2 H, m, 6') ; 4,31 à 4,43 (1 H, m, 7 et 7')

Tableau V-11 : Attribution des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  des esters d'ammonium quaternaire obtenus à partir de l'acide *N*-acétylglutamique et du *N*-acétylglutamate de sodium

Dans la zone comprise entre 2,30 et 2,48 ppm du spectre  $^1\text{H}$ , on observe 4 multiplets correspondants aux  $\text{CH}_2$  en bêta du carbone asymétrique (H 5, Figure V-17) des trois produits

(monosubstitué 1, le monosubstitué 2, le disubstitué) et du réactif, le *N*-acétylglutamate. La composition des mélanges finaux est déterminée grâce à l'intégration des protons (H 5a, b, c et d, Tableau V-11) des esters d'ammonium quaternaire et du réactif. L'intégration des quatre multiplets permet de déterminer la proportion des quatre composés du mélange.

### V.3.3.2. Résultats et discussion

Lors des essais de réaction d'estérification en présence d'acide dodécanoïque, deux paramètres ont permis une amélioration nette du taux de conversion : l'ajout d'un excès de GTA et, dans une moindre mesure, son introduction goutte à goutte. En est-il de même pour la réactivité avec le *N*-acétylglutamate de sodium ?

Une première série de réactions (Tableau V-12, essais 1 et 2) a été réalisée avec un équivalent de GTA par rapport aux fonctions carboxylates (soit 2 équivalents par rapport à l'acide *N*-acétylglutamique). Des rendements de 42 à 45% sont alors obtenus. L'augmentation de la durée d'introduction du GTA, au-delà de 1,5 h, ne semble pas améliorer significativement le rendement et donne une composition des mélanges finaux très proche.

Une deuxième série d'essais, en présence de 1,5 éq. de GTA (Tableau V-12, essais 3 et 4), a permis l'obtention de 2,5 fois plus de composé disubstitué. De plus, **l'ajout d'un excès de GTA accroît de + 30% le rendement de la réaction d'estérification**. Des rendements similaires sont également obtenus avec le tertibutanol.

# CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

essai n°	quantité de GTA (éq. par rapport aux fonctions carboxylates)	durée d'introduction du GTA (h)	T (°C)	solvant	R <sub>E</sub> (%)	composition du mélange final (%)
1	1	1,5	100	butan-2-ol	<b>42</b>	<b>disubstitué : 16</b> monosubstitué 1 : 31 monosubstitué 2 : 21 acide <i>N</i> -acétylglutamique : 32
2	1	3	100	butan-2-ol	<b>45</b>	<b>disubstitué : 19</b> monosubstitué 1 : 31 monosubstitué 2 : 20 acide <i>N</i> -acétylglutamique : 30
3	1,5	3	100	butan-2-ol	<b>72</b>	<b>disubstitué : 50</b> monosubstitué 1 : 11 monosubstitué 2 : 34 acide <i>N</i> -acétylglutamique : 5
4	1,5	3	85	tertibutanol	<b>71</b>	<b>disubstitué : 55</b> monosubstitué 1 : 2 monosubstitué 2 : 30 acide <i>N</i> -acétylglutamique : 13

**Tableau V-12 : Rendements de l'estérification de l'acide *N*-acylglutamique avec le GTA, à reflux du solvant, pendant 6 h (après la fin d'ajout du GTA), sous agitation mécanique**

**Les rendements obtenus avec l'acide *N*-acétylglutamique (environ 70%) sont inférieurs à ceux observés avec l'acide dodécanoïque (environ 90%), dans des conditions opératoires similaires.** Il semble donc que la réactivité des fonctions carboxylates du dodécanoate de sodium soit supérieure à celle du *N*-acétylglutamate de sodium. Les effets électroniques présents dans ces deux molécules pourraient expliquer ces différences de réactivité. En effet, l'effet inductif donneur de la chaîne alkyle, dans le cas de l'acide dodécanoïque, contribue à augmenter la réactivité de la fonction carboxylate par augmentation de la densité électronique, alors que l'effet attracteur de la fonction carbonyle du groupement acétyle du *N*-acétylglutamate tend à diminuer la densité électronique des fonctions carboxylates et donc, à réduire leur réactivité. La différence de rendement observée peut donc être interprétée par l'environnement électronique des radicaux alkyls.

Si l'on analyse maintenant, plus en détail, les résultats obtenus lors de l'estérification de l'acide *N*-acétylglutamique, en présence de GTA, nous pouvons observer non seulement une meilleure transformation du réactif et une forte augmentation de la proportion du composé disubstitué, en présence d'un excès de GTA, mais également que la formation du composé disubstitué se fait principalement au détriment de la présence du composé monosubstitué 1 (essais 3 et 4). Ce résultat pourrait être expliqué par les différences de réactivité des fonctions carboxylates restantes des deux produits monosubstitués. En effet, la fonction carboxylate du composé monosubstitué 2 est plus sensible aux effets attracteurs des deux fonctions carbonyles voisines que celle du monosubstitué 1 et sera donc moins réactive. C'est donc le composé monosubstitué 1 qui réagira préférentiellement avec le GTA et qui conduira à la formation du composé disubstitué. Un suivi cinétique de cette réaction nous permettrait de confirmer ces résultats.

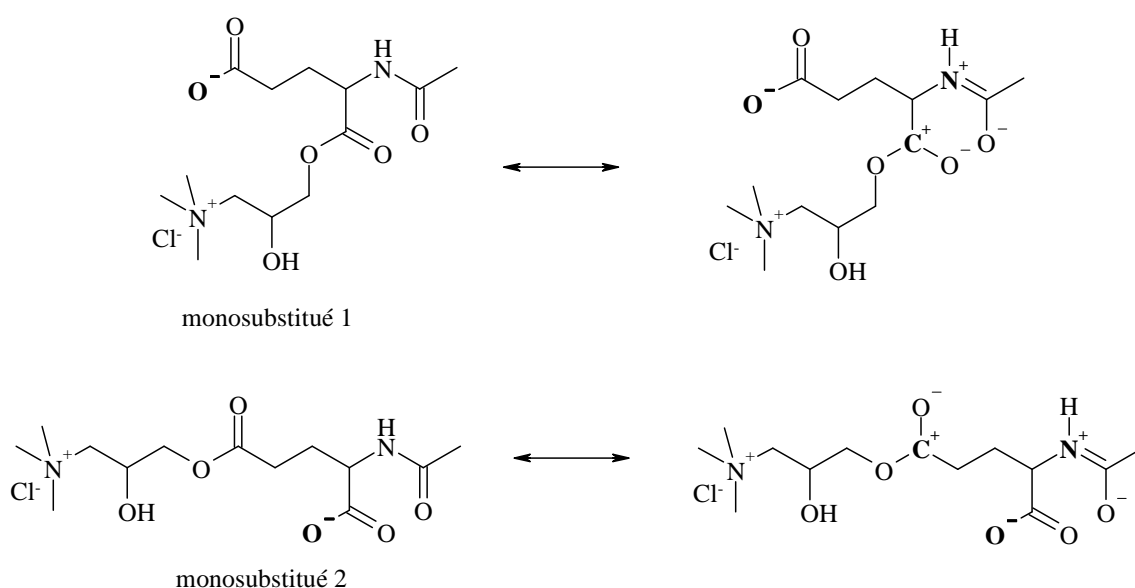


Figure V-18 : Formes mésomères des composés monosubstitués de l'estérification, en présence de GTA

### V.3.3.3. Conclusion

Le taux de conversion de la réaction d'estérification des fonctions carboxylates avec le GTA est amélioré lorsqu'on introduit goutte à goutte un excès de ce dernier que ce soit avec un substrat de type acide aminé ou de type acide gras. **La majorité des fonctions carboxylates (70 à 90%, selon leur réactivité) est convertie en ester. Les mélanges ainsi obtenus ont**

**donc un caractère cationique.** A partir de ces résultats, nous avons alors envisagé d'estérifier, dans ces conditions opératoires, les formulations anioniques issues des protéines de pois obtenues dans le chapitre précédent.

## **V.4. La cationisation des formulations de tensioactifs anioniques issues des protéines de pois**

### **V.4.1. Démarche expérimentale**

Les conditions opératoires mises au point pour la réaction d'estérification sur les molécules modèles est appliquée sur les mélanges de tensioactifs anioniques composés essentiellement de peptides *N*-acylés, riches en acides aspartique et glutamique, et de dodécanoate de sodium. Pour cela, la formulation de peptides *N*-acylés (DH = 32% et DA = 83%), l'hydrogénocarbonate de sodium et le butan-2-ol sont mis en présence. Le mélange est porté à reflux. Puis, le GTA est introduit goutte à goutte, pendant 3 h. A la fin de l'addition, le milieu est maintenu à reflux, sous agitation, pendant 6 heures.

La principale difficulté dans l'étude de cette réaction réside dans l'analyse des produits formés. En effet, étant en présence de mélange, les techniques d'analyse classiques (IR, RMN), effectuées précédemment sur les modèles, ne sont plus applicables. Nous avons donc eu recours à une mesure indirecte permettant d'évaluer le caractère cationique des mélanges obtenus et ainsi évaluer qualitativement le taux de greffage du GTA sur les fonctions carboxylates des tensioactifs anioniques : la **mesure du potentiel zêta des solutions des formulations tensioactives**. Cette mesure est réalisée sur les différentes formulations obtenues. **Le potentiel zêta représente la charge électrostatique que les micelles ou les particules colloïdales acquièrent quand elles sont mises en suspension dans un liquide contenant des ions. Ainsi, le signe du potentiel zêta permet de savoir si l'on est en présence d'une solution anionique ou cationique** (Hunter 1981). A titre d'exemple, pour la solution obtenue à partir du dodécanoate estérifié à 90%, le potentiel zêta obtenu est bien positif, avec une valeur de +52,5 mV (pH 4,1).

Nous avons observé précédemment que l'introduction d'un excès de GTA implique la présence de sa forme ouverte, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, dans les formulations finales. La présence de ce dernier peut perturber les mesures de potentiel zêta. Il

est donc nécessaire de l'éliminer des formulations en amont des analyses. Les produits obtenus après estérification sont donc soit analysés en l'état, soit dialysés afin d'éliminer le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium issu de l'ouverture du cycle époxyde du GTA. Une fraction du produit est dialysée en utilisant des membranes à dialyse possédant un seuil de coupure de 100 Da, et une autre fraction avec des membranes ayant un seuil de coupure de 500 Da. Dans tous les cas, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, les éventuels acides aminés qui n'ont pas été acylés et les sels inorganiques sont éliminés. Cependant, une fraction des molécules tensioactives d'intérêt est également perdue, comme l'ester d'ammonium quaternaire, issu du dodécanoate de sodium. En effet, une perte massique importante de l'échantillon après dialyse est observée. Elle est de 40% pour la membrane dont le seuil de coupure est de 100 Da et de 60% pour celle dont le seuil de coupure est de 500 Da. De plus, la présence de mousse dans l'eau de dialyse confirme la perte de molécules tensioactives.

#### V.4.2. Résultats et discussion

Dans un premier temps, le potentiel zêta est mesuré sur les formulations anioniques à base de peptides *N*-acylés, avant et après dialyse (Tableau V-13). Le potentiel zêta obtenu pour ces mélanges est bien négatif. On remarque que les formulations non dialysées possèdent un potentiel zêta plus négatif que celui des formulations dialysées avec un seuil de coupure de 100 Da, lui-même plus négatif que celui des formulations dialysées avec un seuil de coupure de 500 Da. Cette évolution du potentiel zêta peut être expliquée par la perte de petites molécules tensioactives telles les acides aminés *N*-acylés et le dodécanoate de sodium qui possèdent un potentiel zêta fortement négatif (-88,4 mV, -90,2 mV et -114,1 mV pour le dodécanoate, le *N*<sup>α</sup>-lauroylglutamate et le *N*<sup>α</sup>-lauroylleucine de sodium, respectivement, par exemple, Tableau V-13). Le *N*<sup>α</sup>-lauroylarginine de sodium possède un potentiel zêta négatif de valeur absolue plus faible que les autres acides aminés acylés (-51 mV) en raison de la charge positive du groupe guanidine de la chaîne latérale de l'arginine.

Notons que la valeur du potentiel zêta dépend du pH. Il est donc nécessaire de connaître sa valeur. Le plus pertinent aurait été de déterminer le potentiel zêta des solutions micellaires en fonction de leur pH. De telles mesures n'ont pas pu être réalisées par manque de temps. Toutefois, les déterminations des valeurs de potentiel zêta des formulations ont été réalisées à des pH supérieurs au pK<sub>a</sub> des fonctions acides carboxyliques afin d'avoir ces dernières sous



## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

leur forme carboxylate. Celles des formulations obtenues après cationisation est mesuré à des pH inférieurs au  $pK_b$  des fonctions amines.

solutions tensioactives	dialyse (seuil de coupure en Da)	pH	potentiel zêta (mV)
formulation à base de peptides $N^{\alpha}$ -acylés	Non	10,0	$-92,0 \pm 2,7$
	100	10,0	$-85,0 \pm 1,1$
	500	10,0	$-81,0 \pm 1,0$
dodécanoate de sodium	Non	11,5	$-88,4 \pm 1,1$
$N^{\alpha}$ -lauroylarginine de sodium	Non	11,0	$-51,0 \pm 2,4$
$N^{\alpha}$ -lauroylglutamate de sodium	Non	7,9	$-90,2 \pm 1,5$
$N^{\alpha}$ -lauroylleucine de sodium	Non	8,1	$-114,1 \pm 1,2$

**Tableau V-13 : Valeur de potentiel zêta des solutions à base de tensioactifs anioniques**

Les valeurs de potentiel zêta obtenues sur le dodécanoate de sodium ( $-88,4$  mV, pH 11,5) et le dodécanoate estérifié ( $+52,5$  mV, pH 4,1) confirment la validité de cette méthode indirecte pour évaluer qualitativement le taux de cationisation.

Dans un deuxième temps, le potentiel zêta des mélanges obtenus après cationisation des formulations anioniques à base de peptides  $N$ -acylés dialysés ou non sont déterminés (Tableau V-14).

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

solutions tensioactives	dialyse (seuil de coupure en Da)	potentiel zêta (mV)
formulations à base de peptides <i>N</i> -acylés avec 1,5 éq. de GTA, sans réaction	Non	-56,3 ± 4,9
formulations à base de peptides <i>N</i> -acylés estérifiés avec 1,5 éq. de GTA	Non	-8,7 ± 1,2
	100	-43,4 ± 1,5
	500	-52,3 ± 1,5
formulations à base de peptides <i>N</i> -acylés estérifiés avec 10 éq. de GTA	Non	-11,7 ± 1,1
	100	-15,1 ± 0,4

**Tableau V-14 : Valeur de potentiel zêta des mélanges obtenus après cationisation des formulations anioniques à base de peptides *N*-acylés (pH 7,8)**

On remarque une augmentation du potentiel zêta de l'ordre de +45 mV entre les formulations à base de peptides *N*-acylés avec 1,5 éq. de GTA, sans réaction et celles obtenues après réaction. Toutefois, les valeurs du potentiel zêta demeurent négatives mais sont fortement dépendantes de la composition des mélanges. Les solutions non dialysées possèdent un potentiel zêta plus élevé que celles dialysées. De même, les solutions dialysées avec des membranes possédant un seuil de coupure de 100 Da ont un potentiel zêta plus élevé que les solutions dialysées avec une membrane possédant un seuil de coupure de 500 Da. Ces variations de valeurs de potentiel zêta pourraient être dues à la présence du chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium dans les formulations non dialysées. Au regard de la valeur du potentiel zêta obtenue avec la formulation non dialysée, cationisée avec un large excès de GTA (10 équivalents), cette hypothèse est écartée. En effet, on obtient une valeur de potentiel zêta des formulations obtenues similaire à celle de la formulation analogue cationisée avec 1,5 équivalent de GTA. **Le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, issu de l'ouverture du cycle époxyde du GTA, n'a pas de potentiel zêta.** En effet, cette molécule, soluble dans l'eau, ne présente pas de caractère amphiphile et ne forme pas de micelles. De plus, elle est trop petite pour avoir une mobilité électrophorétique. Toutefois, il semble que celle-ci peut interférer, légèrement, sur les mesures. En effet, une différence de potentiel zêta obtenu entre la formulation à base de peptides *N*-acylés et le mélange de cette même formulation en présence de GTA, sans réaction, est observée (Tableau V-14). Cet écart est probablement dû à un **phénomène d'agrégation entre le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium**

(chargé positivement) et les peptides *N*-acylés (chargés négativement). Ce phénomène d'agrégation serait dû aux fortes interactions électrostatiques entre chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium et les micelles anioniques formées par les tensioactifs.

**Les différences de potentiel zêta entre les différentes solutions, en fonction du traitement de dialyse, proviendraient donc de l'élimination totale de l'ester d'ammonium quaternaire issu du dodécanoate de sodium, lors de la dialyse avec un seuil de coupure à 500 Da, contre une élimination seulement partielle, avec les membranes possédant un seuil de coupure plus petit.** Ainsi, lorsque les formulations cationisées ne sont pas dialysées, un potentiel zêta plus élevé ( $\zeta = -8,7$  mV) est obtenu. En effet, nous avons observé, lors de l'étude de l'estérification du GTA avec les molécules modèles, que des rendements plus importants sont obtenus avec le dodécanoate de sodium par rapport à l'acide *N*-acétylglutamique, en raison de la meilleure réactivité des fonctions carboxylates de l'alcanoate. Il doit en être de même pour l'estérification des peptides *N*-acylés qui constituent le mélange de tensioactifs, d'où la diminution du potentiel zêta avant et après dialyse des mélanges.

Les valeurs de potentiel zêta pour ces trois formulations restent négatives. Il semblerait donc que l'estérification des groupes carboxylates des mélanges de tensioactifs ne soit que partielle. Cependant, **on observe tout de même une cationisation, puisque le potentiel zêta augmente de + 83,3 mV, après cationisation, pour les formulations de peptides *N*-acylés non dialysées.** Ces faibles valeurs de potentiel zêta pourraient être attribuées à l'ouverture du cycle époxyde du GTA, limitant l'estérification des fonctions carboxylates des tensioactifs anioniques. Pour s'en affranchir et améliorer le taux de greffage et donc, par voie de conséquence, d'accroître les valeurs de potentiel zêta, nous avons volontairement réalisé des essais avec un très large excès de GTA (10 équivalents) (Tableau V-14).

L'introduction d'un large excès de GTA ne permet pas l'obtention d'un potentiel zêta positif. Le facteur limitant le greffage du GTA sur les fonctions carboxylates n'est donc pas l'ouverture de l'époxyde, mais un manque de réactivité des fonctions carboxylates. Cette faible réactivité peut être attribuée à l'insolubilité des réactifs dans le butan-2-ol. Une autre série de synthèses est donc réalisée en présence d'eau, afin de solubiliser tous les réactifs. En effet, dans la littérature, les réactions réalisées avec le GTA ont lieu essentiellement dans l'eau (voir paragraphe V.2.3.). La solubilisation de ces derniers permet l'amélioration de la mise en contact des réactifs. Bien que les réactifs soient solubles dans l'eau, les formulations obtenues avec des estérifications en présence d'eau ont un potentiel zêta équivalent à celle

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

obtenues précédemment (Tableau V-15). La présence d'eau contribue à l'ouverture du cycle époxyde du GTA, au détriment de la réaction d'estérification, et ne semble donc pas améliorer la réactivité entre les fonctions carboxylates et le GTA.

solutions tensioactives	dialyse (seuil de coupure en Da)	potentiel zêta (mV)
formulation à base de peptides <i>N</i> -acylés estérifié dans le butan-2-ol	Non	-11,7 ± 1,1
	500	-15,1 ± 0,4
formulation à base de peptides <i>N</i> -acylés estérifié dans un mélange eau/butan-2-ol	Non	-10,2 ± 1,6
	500	-17,1 ± 1,1

**Tableau V-15: Potentiel zêta des différentes formulations après estérification avec le GTA (10 équivalents)  
pH 7,8 - Influence de la présence d'eau lors de l'estérification**

Une deuxième hypothèse, attribuée à la dégradation de l'ammonium quaternaire, pourrait expliquer ces résultats. En effet, les peptides *N*-acylés sont sous forme basique. Or, la présence résiduelle de soude, introduite lors de la *N*-acylation, et la température de réaction élevée (100°C) lors de la cationisation sont des conditions favorables à la dégradation du GTA, selon une élimination d'Hofmann (Vogel 1997). Une odeur caractéristique d'un dégagement de triméthylamine lors des essais conforte cette hypothèse. De même des essais préliminaires de cationisation d'acides aminés (arginine et acide glutamique) *N*-acylés utilisés sous leur forme acide et basique confirment l'hypothèse émise (Tableau V-16). En effet seul les acides aminés *N*-acylés sous forme acide sont cationisés.

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

		avant cationisation		après cationisation	
		pH	potentiel zêta (mV)	pH	potentiel zêta (mV)
mélanges à base d'arginine <i>N</i> -acylée	forme acide	NS	NS	7,0	<b>+107,2 ± 1,5</b>
	forme basique	11,0	-51,0 ± 2,4	10,3	-41,8 ± 1,8
mélanges à base d'acide glutamique <i>N</i> -acylé	forme acide	NS	NS	5,3	<b>+57,3 ± 5,0</b>
	forme basique	7,9	-90,2 ± 1,5	9,7	-70,6 ± 2,3

NS : non soluble

**Tableau V-16 : Potentiel zêta des peptides *N*-acylés sous formes acide et basique après cationisation**

Le premier rôle de la dialyse est d'éliminer les molécules non tensioactives, c'est-à-dire les sels inorganiques et le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium. Cependant, nous avons vu que lors de cette étape, une quantité importante de tensioactifs, en particulier les petits tensioactifs issus de l'acide dodécanoïque et des acides aminés est également perdue. Or, aux regards des résultats du potentiel zêta avant et après dialyse, ce sont ces « petits » tensioactifs (ester d'ammonium quaternaire issu du dodécanoate de sodium) qui sont majoritairement cationiques. Par ailleurs, **le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium est utilisé dans des formulations cosmétiques** (Hardling and Harichian 2006; Deavenport and al. 2007; Harichian and al. 2008). Il peut donc être conservé au sein de la formulation en fonction de l'application visée. Nous avons également observé que les formulations non dialysées obtenues avec 1,5 équivalent de GTA possèdent un potentiel zêta équivalent que celles obtenues avec 10 équivalents. Un faible excès de GTA lors de la cationisation est donc suffisant. **On pourra donc réaliser la cationisation des formulations à base de lipopeptides à l'aide de 1,5 équivalent de GTA sans dialyse, pour des applications en cosmétique, par exemple.**

### V.4.3. Conclusion

**L'estérification des formulations à base de peptides *N*-acylés (DH = 32% et DA = 83%) à l'aide du GTA, dans le butan-2-ol, en présence d'hydrogénocarbonate en quantité catalytique, a permis la cationisation des molécules amphiphiles. En effet, une**

**augmentation du potentiel zêta de +83,3 mV a été mesurée entre les formulations à base de peptides *N*-acylés avant et après estérification**, en présence de 1,5 équivalent de GTA par rapport aux fonctions carboxylates.

Il serait intéressant de réaliser la cationisation sur les formulations de tensioactifs anioniques, sous leur forme acide, afin de limiter la dégradation du GTA selon une élimination d'Hofmann et obtenir ainsi des mélanges de tensioactifs possédant un potentiel zêta positif. Ces travaux sont actuellement en cours de réalisation.

Au regard des valeurs de potentiels zêta des formulations obtenues, négatives mais proche de zéro, **il semblerait que les mélanges soient donc constitués de tensioactifs de nature différente : anioniques, amphotères et cationiques. Ainsi, on obtient une nouvelle gamme de tensioactifs**, dont il faut évaluer les nouvelles propriétés de surface de ces nouvelles formulations.

## **V.5. Propriétés tensioactives des formulations obtenues après cationisation**

Les propriétés tensioactives de ces nouveaux mélanges de molécules amphiphiles sont évaluées de manière analogue aux formulations anioniques.

### **V.5.1. Tension de surface et concentration micellaire critique**

La tension de surface en fonction de la concentration est mesurée pour les différentes formulations obtenues après cationisation. **Les CMC (entre 80 et 125 mg/L) et les tensions de surface à la CMC (entre 31 et 33 mg/L) de ces dernières sont légèrement supérieures à celles obtenues pour des peptides *N*-acylés** (Tableau V-17). Cependant, elles restent nettement inférieures aux SDS et CTAB. Les formulations obtenues possèdent donc une très bonne activité de surface.

La dialyse, quel que soit le seuil de coupure, ne semble pas avoir d'effet notable sur les propriétés de surface des formulations. En effet, bien que des molécules n'ayant pas de propriétés de surface tels que les sels inorganiques, les acides aminés, le GTA ouvert soient éliminés, de petites molécules qui possèdent d'excellentes propriétés de surface telles que, par exemple, l'ester d'ammonium quaternaire issu du dodécanoate de sodium sont également

perdues. Un équilibre entre la perte des molécules non tensioactives et les composés d'intérêt est donc observé.

L'augmentation importante de la CMC du dodécanoate de sodium estérifié à 90% avec 1,5 équivalent de GTA est due à la présence du chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium issu de l'ouverture du cycle époxyde du GTA introduit en excès. En effet, ce dernier ne possède pas de caractère amphiphile et n'a pas été éliminé contrairement aux autres formulations cationisées. Par contre **la cationisation du dodécanoate de sodium donne un ester d'ammonium quaternaire qui possède une très forte activité de surface, avec une tension de surface de 25,9 mN/m à sa CMC.**

tensioactifs	CMC (mg/L)	TS à la CMC (mN/m)
formulation à base de peptides <i>N</i> -acylés non dialysée	75 ± 10	28,4 ± 0,5
formulations à base de peptides <i>N</i> -acylés cationisés avec 1,5 éq. de GTA	non dialysée	110 ± 10
	dialysée (100 Da)	90 ± 5
	dialysée (500 Da)	115 ± 10
dodécanoate de sodium	70 ± 20	34,1 ± 0,5
dodécanoate de sodium estérifié avec le GTA à 90%	160 ± 20	25,9 ± 0,5
SDS	240 ± 30	39,1 ± 0,5
CTAB	230 ± 30	37,2 ± 0,5

Tableau V-17 : CMC et tension de surface à la CMC des formulations à base de peptides *N*-acylés avant et après la *N*-acylation

### V.5.2. Propriétés moussantes

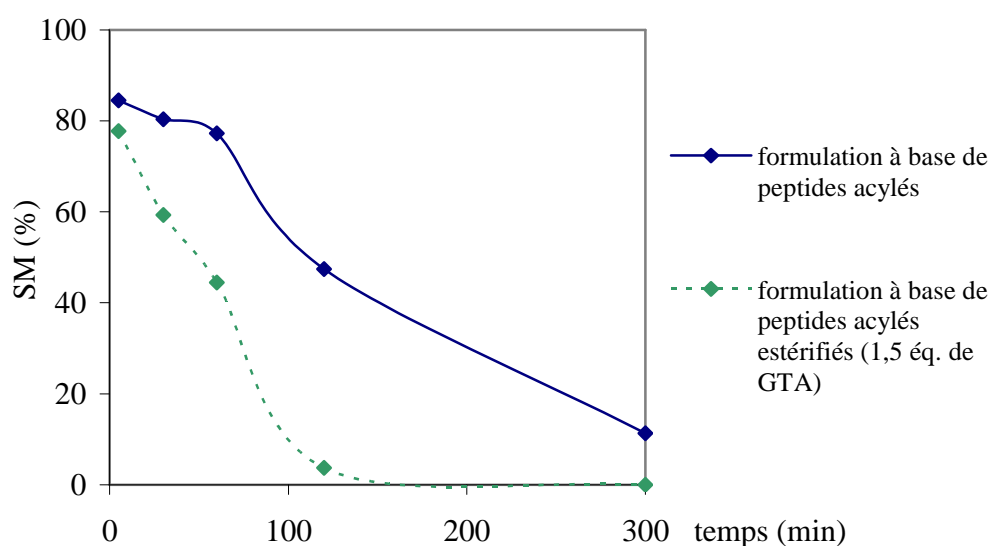
La capacité moussante et la stabilité des mousses de la solution obtenue à partir des formulation non dialysée à base de peptides *N*-acylés après cationisation ont été mesurées (Tableau V-18 et Figure V-19). **La formulation après cationisation a une plus faible capacité et stabilité moussante qu'avant la cationisation.** Ces moins bonnes propriétés

## CHAPITRE V : CATIONISATION DES TENSIOACTIFS ANIONIQUES : GREFFAGE D'UN AMMONIUM QUATERNAIRE SUR LES FONCTIONS CARBOXYLATES

moissantes pourraient être attribuées à la présence du chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, provenant de l'hydrolyse du GTA.

formulation à base de peptides <i>N</i> -acylés	230 ± 5
formulation à base de peptides <i>N</i> -acylés cationisés avec 1,5 éq. de GTA, non dialysée	100 ± 5
dodécanoate de sodium	200 ± 5
dodécanoate de sodium estérifié à 90% avec 1,5 éq. de GTA	230 ± 5

**Tableau V-18 : Capacité moussante des formulations à base de peptides *N*-acylés avant et après cationisation non dialysées**



**Figure V-19 : Stabilité moussante des formulations à base de peptides *N*-acylés avant et après cationisation**

Parallèlement, des mesures de capacités moussantes ont été réalisées sur les formulations à base de peptides *N*-acylés cationisés avant et après dialyse (seuil de coupure de 500 Da) mais sur de plus faibles quantités (1,5 g de formulation dans 150 mL d'eau, contre 3 g de mélange de tensioactifs dans 300 mL d'eau) (Tableau V-19). Ces résultats semblent montrer que les composés non amphiphiles ioniques éliminés lors de la dialyse (ammonium quaternaire issu



de l'hydrolyse du GTA, chlorure de sodium, hydrogénocarbonate de sodium...), perturbent fortement les propriétés moussantes de ces formulations. En effet, dans le cas des tensioactifs ioniques, le pouvoir moussant est fonction de la solvation et donc du contre-ion associé (Larpent 1993).

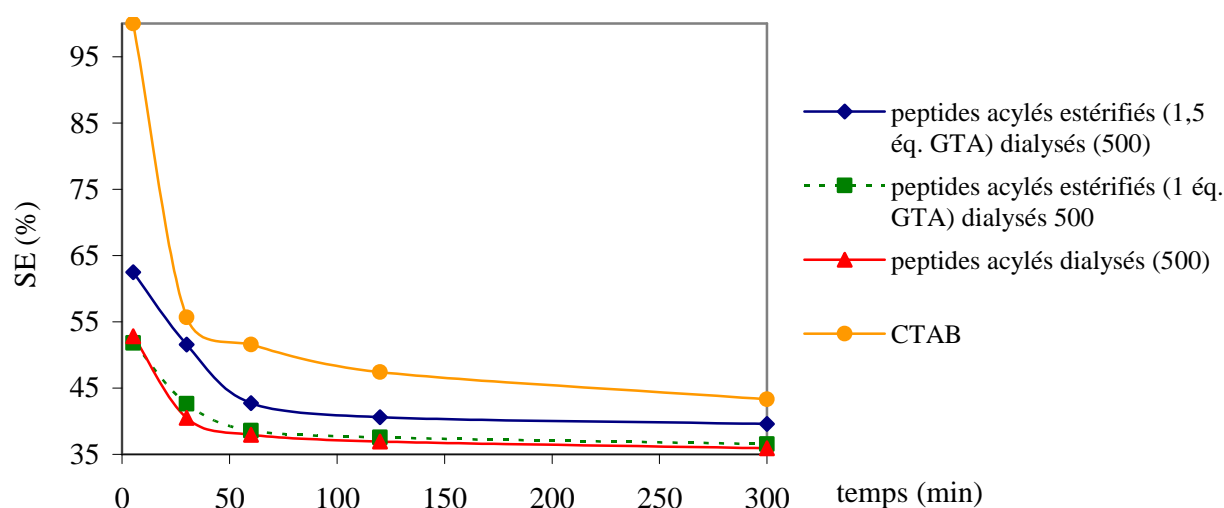
non dialysée	150 ± 5
dialysée (seuil de coupure = 500 Da)	310 ± 5

**Tableau V-19 : Capacité moussante de formulation à base de peptides *N*-acylés estérifiés (1,5 éq. de GTA) mesurée sur 1,5 g de mélange – Influence de la dialyse**

Si les propriétés de surface ne semblent pas être sensiblement affectées par la dialyse (équilibre entre la perte de molécules tensioactives et non tensioactives), les propriétés moussantes le sont fortement. Il sera donc très important de bien définir les étapes ou non de purification selon les applications envisagées.

### V.5.3. Propriétés émulsifiantes

Après agitation, **toutes les émulsions formées ont une capacité émulsionnante de 100%**. La stabilité des émulsions au cours du temps est ensuite mesurée (Figure V-20). **La meilleure stabilité émulsionnante est obtenue avec la formulation à base de peptides *N*-acylés et estérifiés**. Ces résultats sont en accord avec la littérature : les tensioactifs cationiques possèdent de meilleures propriétés émulsifiantes que les tensioactifs anioniques (Rouanet and Blet 1972). Toutefois, les formulations obtenues possèdent une moins bonne stabilité moussante que le CTAB, tensioactif cationique commercial.



**Figure V-20 : Stabilité émulsifiante des formulations à base de peptides *N*-acylés cationisés - Influence de la cationisation**

L'influence de la dialyse sur la stabilité émulsifiante est évaluée (Figure V-21). Les formulations dialysées ont une meilleure stabilité émulsionnante comparée à la formulation non dialysée. Cette dernière contient du chlorure de sodium formé au cours des réactions précédentes (hydrolyse et *N*-acylation) qui favorise la rupture de l'émulsion, tout comme pour les formulations à base de peptides *N*-acylés non dialysées comparées à leurs homologues dialysés (voir chapitre IV, paragraphe IV.3.2.3.).

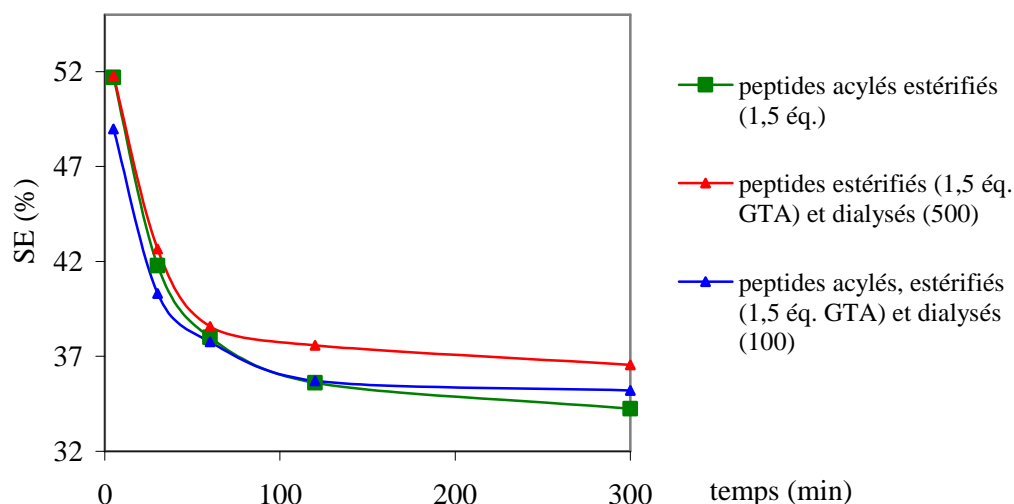


Figure V-21 : Stabilité émulsifiante des formulations à base de peptides *N*-acylés cationisés - Influence de la dialyse

## V.6. Conclusion générale

**L'estérification des formulations tensioactives à base de peptides *N*-acylés**, obtenues précédemment (chapitre III et IV) à l'aide de procédés respectant les grands principes de la chimie verte, **a pu être réalisée à l'aide du GTA**, après mise au point du protocole opératoire sur deux molécules modèles : l'acide dodécanoïque et l'acide *N*-acylglutamique. Cette mise au point a pu être réalisée grâce à la caractérisation des mélanges par spectroscopie RMN. La choline, moins toxique, a été également testée, mais n'est pas suffisamment réactive pour former des esters d'ammonium quaternaire. Notons que le GTA n'est plus présent sous sa forme époxyde en fin de réaction, mais sous sa forme ouverte, dont la structure est très proche de celle de la choline. Ce diol, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium, est d'ailleurs introduit dans des formulations cosmétiques afin d'accroître leurs propriétés adoucissantes et hydratantes (Hardling and Harichian 2006; Deavenport and al. 2007; Harichian and al. 2008). Pour de telles applications, on peut donc envisager la suppression de l'étape de dialyse, dont le principal but est l'élimination du diol. Dans ce cas, **l'utilisation du GTA permet d'obtenir une formulation de tensioactifs, sans étape de purification, possédant des coproduits qui apportent de nouvelles propriétés aux mélanges.**

Les valeurs de potentiel zêta obtenues montrent que les formulations anioniques ont été cationisées. En effet, **une variation de +83,3 mV est obtenue entre avant et après estérification avec 1,5 équivalent de GTA par rapport aux fonctions carboxylates.** Cependant, les valeurs de potentiel zêta des formulations à base de peptides *N*-acylés et estérifiés restent négatives, mais proches de la neutralité. Il semblerait donc que le taux d'estérification des fonctions carboxylates ne dépasse pas les 50% souhaités. **Les formulations sont donc des mélanges de tensioactifs de nature anionique, amphotère et cationique, ce qui est confirmé par la large distribution de charge des micelles.**

Cependant, **les formulations obtenues présentent des propriétés tensioactives qui confortent le fait que nous sommes en présence d'un mélange de molécules amphiphiles à caractère partiellement cationique.** En effet, elles possèdent de meilleures propriétés émulsifiantes que les formulations anioniques à base de peptides *N*-acylés.

Pour éviter les réactions de dégradation, il est nécessaire de garder les acides aminés *N*-acylés sous forme acide (suppression de la dernière étape de purification qui consiste à les faire passer sous forme de sels de sodium) et de transformer les peptides *N*-acylés sous forme acide ( $\text{pH} < 7$ ) à la fin de la réaction de *N*-acylation, avant la lyophilisation. De même, une diminution de la température à 85°C permettrait également de réduire ces réactions secondaires. De tels essais sont en cours sur les acides aminés (arginine, leucine et acide glutamique) *N*-acylés et sur les peptides *N*-acylés. Il sera ensuite intéressant d'évaluer leurs propriétés tensioactives et antimicrobiennes et de les comparer à celle des tensioactifs cationiques commerciaux dont les propriétés biocides sont connues. Cela permettrait d'étendre le champ d'application de ces nouveaux mélanges de molécules amphiphiles.

Par ailleurs, certaines questions scientifiques n'ont pas été abordées lors de cette thèse. Nous avons vu au chapitre I que des synergies peuvent exister au sein de mélanges de tensioactifs. Il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre les familles de tensioactifs présents dans nos mélanges (tensioactifs à base d'acides gras et de peptides, tensioactifs anioniques et cationiques,...) et les synergies qui pourraient exister au niveau des propriétés tensioactives. De plus, nous nous sommes principalement intéressés aux propriétés macroscopiques des formulations tensioactives. Or, une approche microscopique (organisation et type des micelles obtenues, temps moyen de relaxation de celles-ci, étude microscopique des mousses et émulsions formées...) permettrait une meilleure compréhension de ces systèmes.

Enfin, l'ensemble des formulations tensioactives obtenues représente une « boîte noire » dont la caractérisation n'est pas aisée en raison de la complexité de ces mélanges. Une approche de type « reverse engineering » permettrait de mieux comprendre et appréhender ces systèmes complexes et d'optimiser leur obtention, leurs formulations et leurs applications.

## BIBLIOGRAPHIE

Bendoraitienė J., Kavaliauskaite R. K., R. and Zemaitaitis A. (2006) Peculiarities of starch cationization with Glycidyltrimethylammonium Chloride. *Starch*. 58:623.

Bergfeld M., Ahrens H. and Carstens A. (1997) Esterification method and oxyacid catalysts for the preparation of esterquats derived from hydroxyalkyl quaternary ammonium salts. Patent N° EP9747588.

Carmona-Ribeiro A., Vieira D.B. and Lincopan N. (2006) Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 5(1):33.

Cassier T. and Schreiber B. (2006) Functionzl systems with reducezd odor cationic polygalactomannan. Patent N° WO2006026750.

Claridge T.D.W. (1999) Introduction high-resolution NMR. In *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. T. D. W. Claridge, Ed. Pergamon: Oxford, Vol. 19, p 43.

Deavenport J.L., Posey R.C. and Wilson D.A. (2007) Process for preparing dihydrotrialkylammonium halides and products thereof. Patent N° US20070299284.

Fuxi S., Wanbin Z., Gong W. and Tao Y. (1993) Study on the synthesis and antistatic effect of quaternary ammonium salt of fatty ester. *Hadong Huagong Xueyuan Xuebao*. 19(5):594.

Günther H. (1995) NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry. New-York, Wiley.

Hanson R.M. (1991) The synthetic methodology of nonracemic glycidol and related 2,3-epoxy alcohols. *Chemical Reviews* *Chemical Reviews*. 91:437.

Hardling C.R. and Harichian B. (2006) Quaternary ammonium polyol salts as anti-aging actives in personal care composition. Patent N° US20060089277.

Harichian B., Loren McManus R., Hurley M.K., Miner P.E., Chandar S. and Barroy R. (2008) Personal care compositions with glycerin and hydroxypropyl quaternary ammonium salts. Patent N° US7282471.

Hunter R.J. (1981) Zeta potentiel in colloid science: principles and applications. London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press.

Jawed S. and Manian R. (2002) Modification of soy flour proteins for producing coagulants in papermaking and waste water treatment. Patent N° WO02056095.

Kahre J., Hensen H., Mueller-Kirschbaum T., Goebels D. and Tesmann J. (2003) Hair aftertreatment preparations. Patent N° US655101.

Kim J.Y., Lee J.K., Lee T.S. and Park W.H. (2003) Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 32:23.

Landini D., Maia A. and Rampoldi A. (1986) Stability of quaternary onium salts under phase-transfer conditions in the presence of aqueous alkaline solutions. *Journal of Organic Chemistry*. 51:3187.

Larpent C. (1993) Tensioactifs. In *Techniques de l'ingénieur*. Vol. K 342, pp 1-15.

Philippe M. and Campos A. (1998) Procédé de préparation de dérivés d'ammoniums quaternaires hydroxypropyles à fonction ester d'acide gras. Patent N° EP0847985.

Prelog V. and Helmchen G. (1982) Basic principles of CIP-system and proposals for a revision. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 21:567.

Rouanet J. and Blet C. (1972) Fatty amines, cationic surfactants. *Informations Chimie*. No. 110:73.

Ryzhkov Y.A. (1994) Synthesis and thermal stability of cationic surface-active dimethylaminoethanol derivatives. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 67(5):734.

Shiyu F., Huaiyu D. and Min D. (2008) Preparation of ammonium quaternized gluten for papermaking. Patent N° CN101182687.

Steichen D.S. (2002) Cationic surfactant. In *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. K. Holmberg, Ed. John Wiley & Sons: Vol. 1, p 309.

Sunitha S., Kanjilal S., Reddy P.S. and Prasad R.B.N. (2007) Liquid-liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride.2ZnCl<sub>2</sub>. *Tetrahedron Letters*. 48(39):6962.

Takayanagi Y. and Endo M. (1994) Manufacture of unsaturated quaternary ammonium salts. Patent N° JP06279371.

Ullmann. (1986) In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th ed.; Vol. A7, p 39.

Vogel P. (1997) Chimie organique. Méthodes et modèles. Paris, Bruxelles, De Boeck Université.





# **CONCLUSION GENERALE**

---

## CONCLUSION GENERALE

En réponse, d'une part, à une forte demande sociétale d'une chimie durable écoresponsable et respectueuse de l'environnement et, d'autre part, aux exigences de la réglementation REACH sur les produits chimiques, les bioproduits connaissent un développement important ces dernières années. Parmi eux, les biotensioactifs et tout particulièrement ceux à base de sucres tels que les alkylpolyglucosides occupent une place de choix sur le marché des nouveaux tensioactifs. De nature non ionique, ces tensioactifs offrent une réponse positive pour un certain nombre d'applications.

De part le caractère ionique et hydrophile des acides aminés qui les composent, les protéines, matière première naturelle, renouvelable et disponible, peuvent être des composés intéressants pour obtenir une autre famille de tensioactifs : les tensioactifs ioniques.

Parmi les sources protéiques disponibles, nous avons donc sélectionné, comme matière première de départ, les **protéines de pois**, en raison des nombreux avantages qu'elles présentent (richesse en acides aminés basiques, protéines non allergènes, culture qui ne nécessite pas l'apport d'engrais azoté...). L'isolat protéique de départ a été ensuite caractérisé. Il contient plus de 96% de matière sèche qui renferme **82% de protéines**. Puis, l'isolat protéique a été hydrolysé afin d'obtenir la partie hydrophile des nouveaux biotensioactifs. La **voie enzymatique**, à l'aide de protéases (Alcalase et Flavourzyme), a été retenue en raison de sa plus grande adéquation avec les principes de la chimie verte par rapport à l'hydrolyse chimique. L'optimisation des paramètres d'hydrolyse a été réalisée et a permis l'obtention d'hydrolysats dont le degré d'hydrolyse est compris entre 16 et 36%, après 30 min d'incubation. La distribution de la taille des peptides obtenus n'a pas été déterminée. Des travaux sont actuellement en cours afin de mieux connaître la nature des hydrolysats obtenus et ainsi améliorer la compréhension des matrices peptidiques. Par ailleurs, nous n'avons pas tenté d'atteindre des degrés d'hydrolyse supérieurs à 36%. Or, aux regards des résultats préliminaires sur la distribution de taille des peptides qui montrent la présence de masses molaires jusqu'à 70 kDa, il serait intéressant de déterminer les conditions d'hydrolyse qui permettraient d'obtenir des hydrolysats à haut degré d'hydrolyse. En effet, d'après la littérature, l'hydrolyse à l'aide de l'Alcalase et de la Flavourzyme permet d'atteindre des degrés d'hydrolyse de 50%.

L'étape suivante a consisté à greffer la chaîne carbonée sur les têtes hydrophiles obtenues selon une ***N*-acylation de Schotten-Baumann**. Pour cela, la mise au point de la réaction a été réalisée sur des acides aminés modèles. Les taux de conversion des acides aminés, déterminés par méthode spectrométrique (OPA), obtenus avec 1,5 équivalent de chlorure d'acide, en milieu basique, après 3 h de réaction, à 50°C, sont compris entre **53 et 90%** en fonction de l'acide aminé utilisé et de la longueur de la chaîne greffée. Dans ces conditions opératoires, le chlorure d'acide en excès est hydrolysé en alcanolate de sodium. Ce dernier est une molécule amphiphile connue pour ses propriétés tensioactives. La composition des mélanges obtenus après purification a été déterminée par RMN. Ces derniers sont des mélanges binaires de tensioactifs constitués du sel de sodium de l'acide *N*<sup>α</sup>-acylaminé et de l'alcanolate de sodium. La RMN a également révélé que les acides *N*<sup>α</sup>-acylaminés sont présents sous différentes formes isomères. L'étude de l'influence des conditions opératoires sur les structures finales des produits et l'influence de ces dernières sur les propriétés des mélanges et les synergies seraient particulièrement intéressantes. Ainsi, un unique acide aminé donne un mélange complexe de tensioactifs. Cette réaction de *N*-acylation a été ensuite étendue aux hydrolysats protéiques de pois en présence du chlorure de dodécanoyl, avec des **taux de conversion des fonctions amines qui atteignent 83%**.

Les propriétés tensioactives de ces mélanges, majoritairement anioniques, ont été déterminées et comparées à des références commerciales et académiques. Les formulations anioniques issues de la *N*-acylation de Schotten-Baumann des acides aminés modèles possèdent une activité de surface élevée qui peut atteindre, par exemple, **310 mg/L** pour le mélange de sels de sodium de *N*<sup>α</sup>-dodécylleucine/dodécanoate de sodium, avec une tension de surface de **30,1 mN/m**. Ils peuvent, dans certain cas, présenter des **synergies**. C'est le cas, par exemple, du mélange *N*<sup>α</sup>-décanoylleucine/décanoate de sodium (dont le ratio molaire est de 51/49) qui possède une CMC de 560 mg/L. Cette valeur est inférieure à la CMC de la solution de *N*<sup>α</sup>-décanoylleucine seul, qui est de 976 mg/L et à celle du décanoate de sodium seul, qui est de 2700 mg/L. **Avec les hydrolysats protéiques *N*-acylés**, on obtient des formulations ayant une **CMC de l'ordre de 75 mg/L**, soit une concentration trois fois inférieure à celle du SDS, avec **une tension de surface de 28,4 mN/m**, contre 39,1 mN/m pour ce dernier. Par ailleurs, ces formulations possèdent des propriétés moussantes et émulsifiantes équivalentes voire supérieures à celles de tensioactifs pétrochimiques commerciaux. De telles propriétés sont particulièrement recherchées dans les domaines de la détergence, de la cosmétique... Ainsi,

ces formulations, obtenues à partir de ressources naturelles renouvelables et de réactions respectueuses de l'environnement, pourraient, pour certaines applications, remplacer les tensioactifs pétrochimiques. De plus, on obtient, in fine, des formulations directement utilisables ce qui représente un intérêt économique.

L'évaluation du paramètre  $\beta$  des mélanges tensioactifs binaires obtenus avec les acides aminés modèles, ainsi que l'étude de ces systèmes permettrait l'évaluation de la synergie et une meilleure compréhension de ces derniers.

La dernière étape a consisté en l'obtention de tensioactifs cationiques à partir des formulations de tensioactifs précédemment obtenus. Pour cela, nous avons eu recours à une molécule bifonctionnelle, possédant un ammonium quaternaire et une fonction réactive vis-à-vis des groupements carboxylates des tensioactifs anioniques. Après des essais préliminaires sur l'acide dodécanoïque, utilisé comme substrat modèle, le meilleur candidat s'est avéré être le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTA). La réaction d'estérification mise au point entre la fonction époxyde du GTA (introduit en excès) et les fonctions carboxylates du dodécanoate de sodium et du *N*-acétylglutamate de sodium a conduit à des **taux de conversion, déterminés par RMN, de 90 et 70%**, respectivement. Il faut noter que le GTA n'est plus présent sous sa forme époxyde en fin de réaction, mais sous sa forme ouverte, le chlorure de 1,2-dihydroxypropylammonium. Ce dernier est introduit dans des formulations cosmétiques afin d'accroître leurs propriétés adoucissantes et hydratantes. Sa présence apporte donc de nouvelles propriétés aux mélanges. En fonction de l'application visée, l'étape de purification permettant l'élimination de ce coproduit, telle que la dialyse, n'est pas nécessaire. Les formulations de peptides acylés sont ensuite cationisées à l'aide du GTA. Etant en présence de mélanges complexes, les analyses classiques (IR, RMN), effectuées précédemment sur les substrats modèles, ne sont plus applicables. Nous avons donc eu recours à une mesure indirecte permettant d'évaluer le caractère cationique des mélanges obtenus et ainsi d'évaluer qualitativement le taux de greffage du GTA sur les fonctions carboxylates des tensioactifs anioniques : la mesure du potentiel zêta des solutions tensioactives. Les valeurs de potentiel zêta obtenues montrent que les formulations anioniques ont été cationisées. En effet, **une variation du potentiel zêta de +83,3 mV** est obtenue pour les formulations pré et post-estérification. Cependant, les valeurs de potentiel zêta des formulations à base de peptides acylés et estérifiés restent négatives, mais proches de la neutralité. Les formulations dialysées présentent des potentiels plus négatifs que celles non

dialysées en raison de l'élimination lors de la dialyse des petites molécules tensioactives cationiques. Le taux d'estérification atteint des fonctions carboxylates n'a donc pas été suffisant. Les formulations sont des mélanges de tensioactifs de nature anionique, amphotère et cationique qui possèdent de bonnes propriétés tensioactives avec des **CMC autour de 100 mg/L et une tension de surface à la CMC de l'ordre de 31 mN/m**.

Afin d'améliorer le taux de greffage du GTA sur les fonctions carboxylates des tensioactifs, il faudrait se placer dans des conditions qui permettraient d'éviter les réactions de dégradation du GTA (élimination d'Hofmann, hydrolyse de l'époxyde). Pour cela, il est nécessaire de garder les acides aminés acylés sous forme acide et de transformer les peptides acylés sous forme acide. De même, une diminution de la température de réaction permettrait également de réduire ces réactions secondaires. De tels essais sont en cours sur les acides aminés (arginine, leucine et acide glutamique) et peptides acylés. Les propriétés tensioactives et antimicrobiennes de ces nouvelles formulations de tensioactifs cationiques devront être évaluées. Cela permettrait d'étendre le champ d'application de ces nouveaux mélanges de molécules amphiphiles. Il serait également intéressant de démontrer le caractère biodégradable de ces formulations ainsi que leur non écotoxicité, afin de s'assurer qu'elles remplissent les conditions de REACH.

De même, la cationisation en présence de choline, molécule naturelle, devrait être poursuivie en répondant aux questions scientifiques telles que son mode d'activation ou encore sa fonctionnalisation dirigée dans des systèmes aux interfaces.

Par ailleurs, certains aspects scientifiques n'ont pas été abordés et représentent des perspectives de taille, telles que l'étude des synergies qui peuvent exister au sein des mélanges de tensioactifs, l'approche microscopique des systèmes obtenus (mousses, émulsions) à partir de ces nouvelles formulations. Il serait intéressant d'étudier les interactions entre les familles de tensioactifs présents dans ces mélanges afin de prédire les synergies qui pourraient exister entre les composés amphiphiles qui les composent. Par ailleurs, l'étude de l'organisation, du type et du temps de relaxation des micelles obtenues, l'étude microscopique des mousses et des émulsions formées permettraient une meilleure compréhension de ces systèmes.



# ANNEXES

## ANNEXES

Ensemble des spectres RMN (1D et 2D) du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium (Figure A-1 à A-5).

Ensemble des spectres RMN (1D et 2D) du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique (Figure A-6 à Figure A-14).

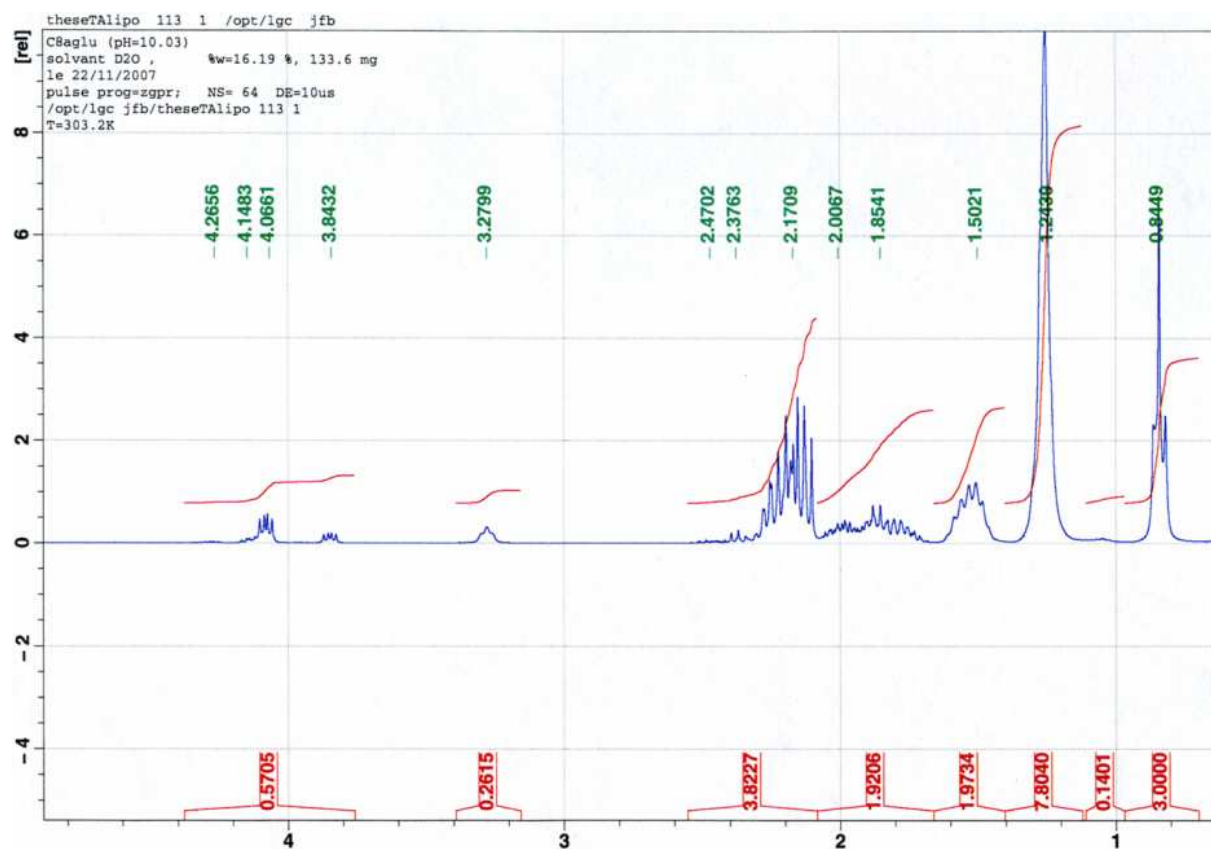


Figure A-1: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium



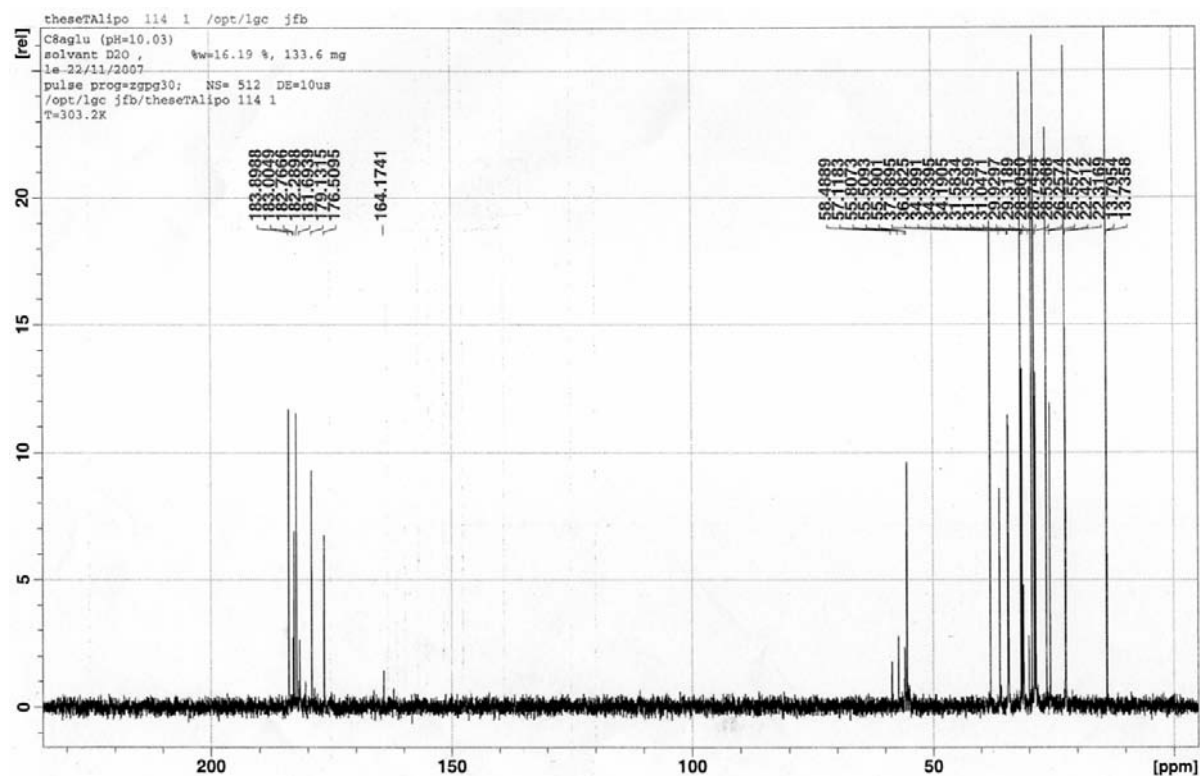


Figure A-2: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium

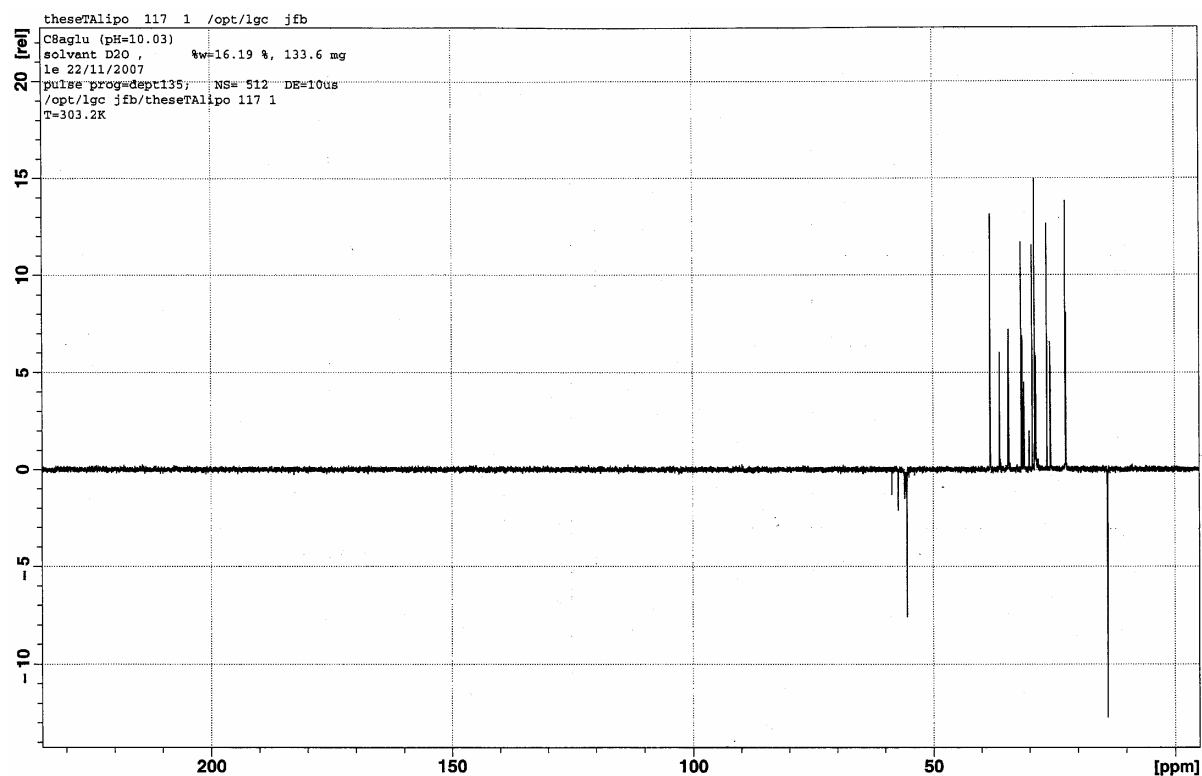


Figure A-3: Spectre RMN dept135 du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium

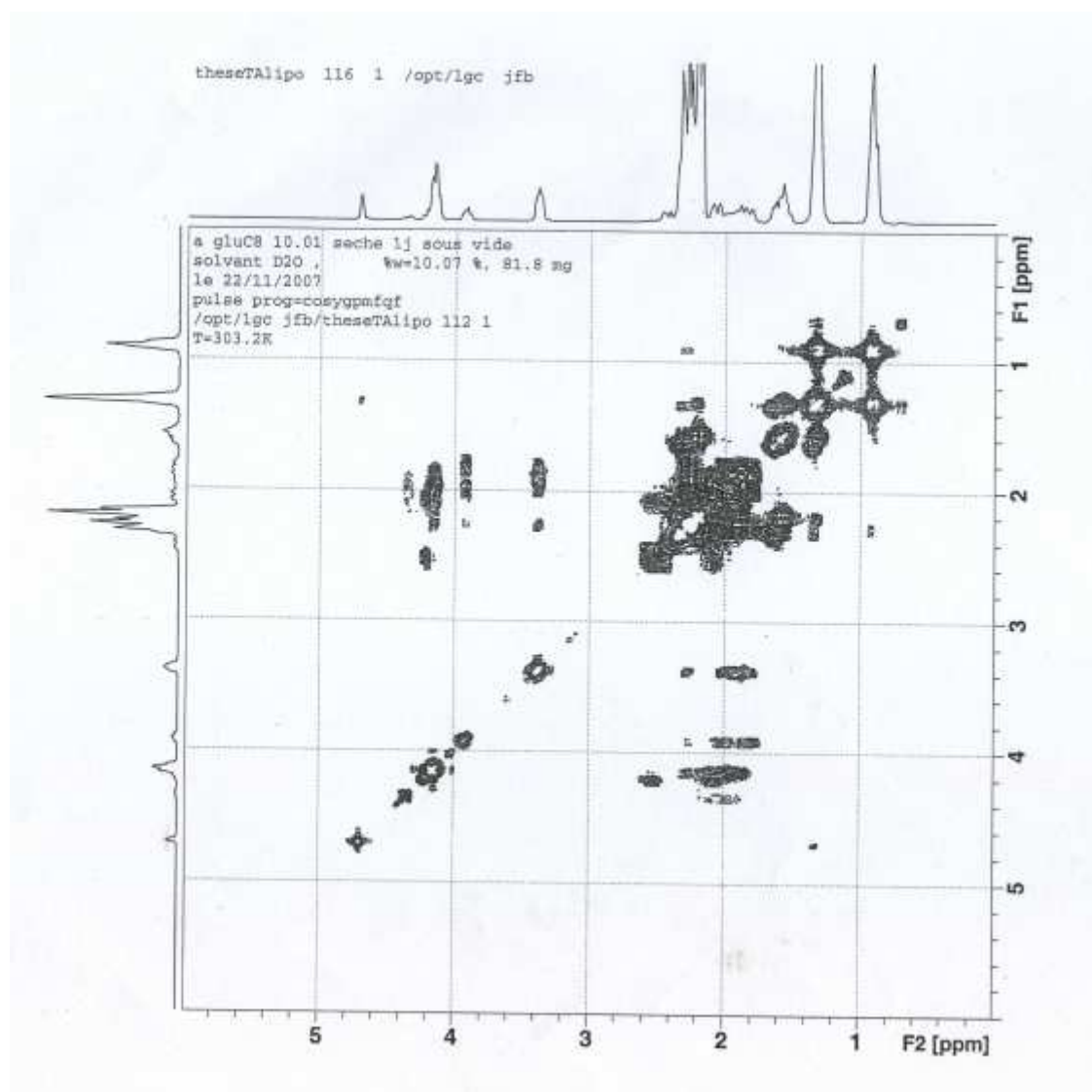


Figure A-4 : Spectre RMN cosyDQF du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium

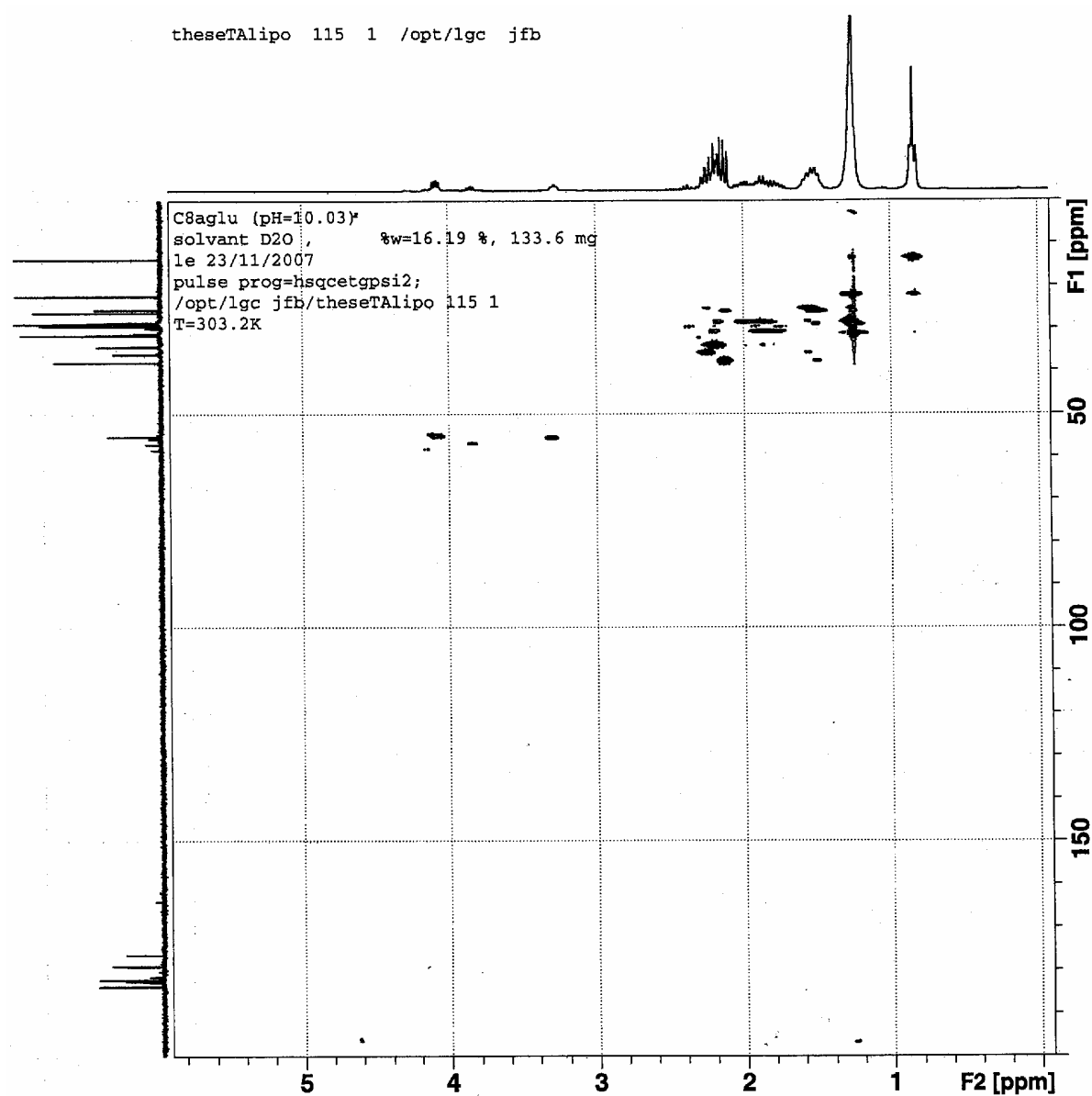


Figure A-5: Spectre hsqc du mélange à base d'octanoylglutamate de sodium

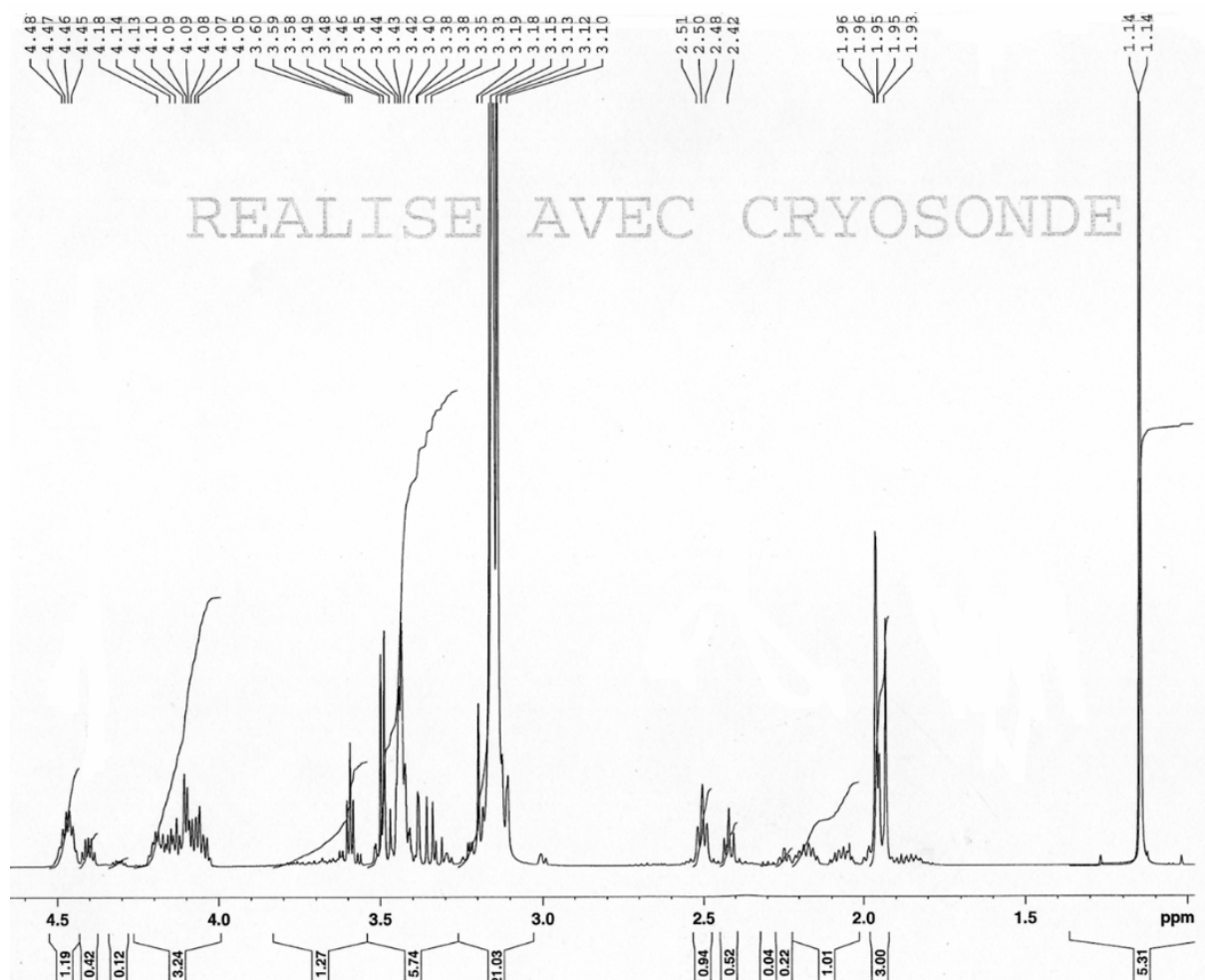


Figure A-6 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique

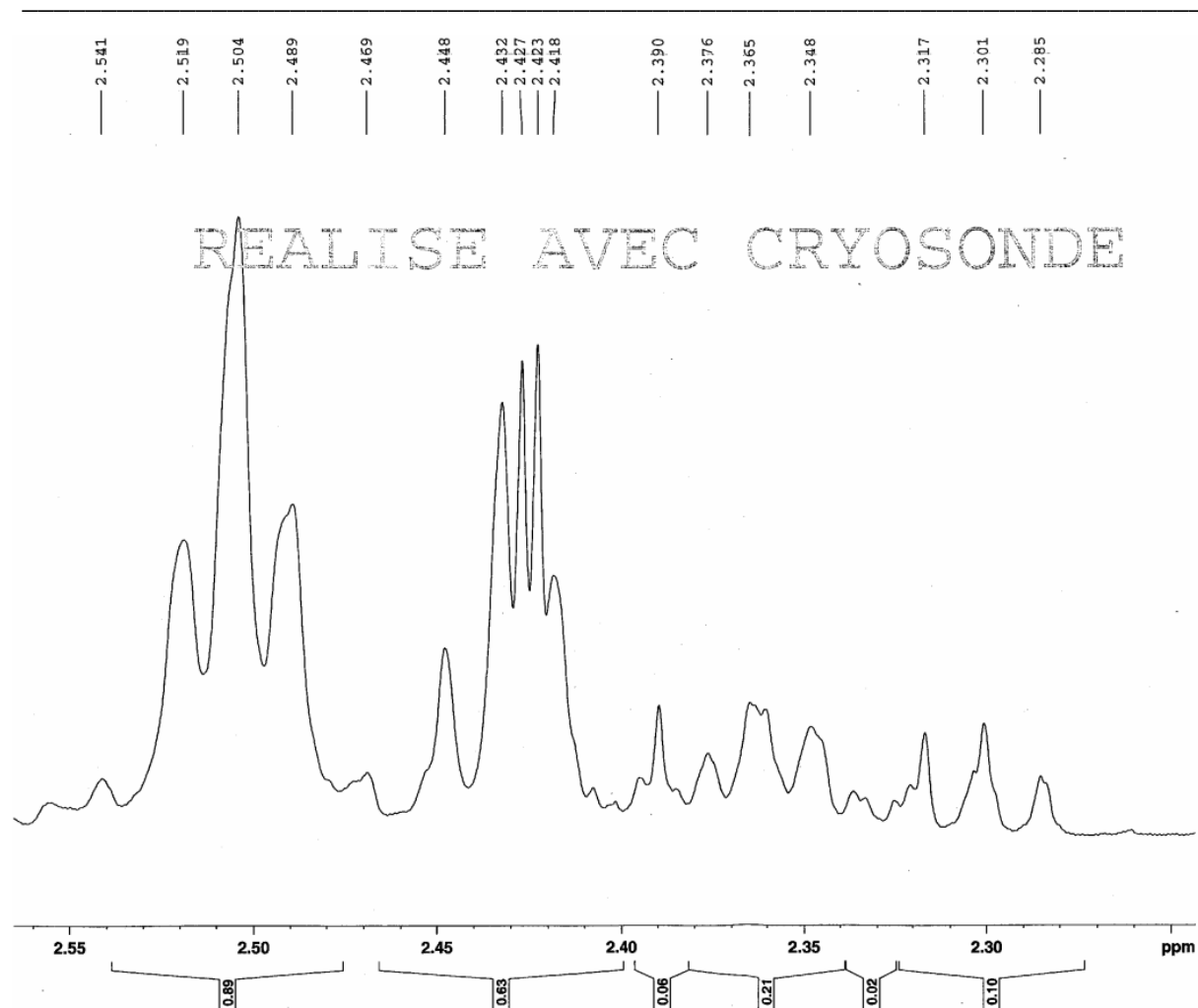


Figure A-7 : Zoom de 2,25 à 2,55 ppm du spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique

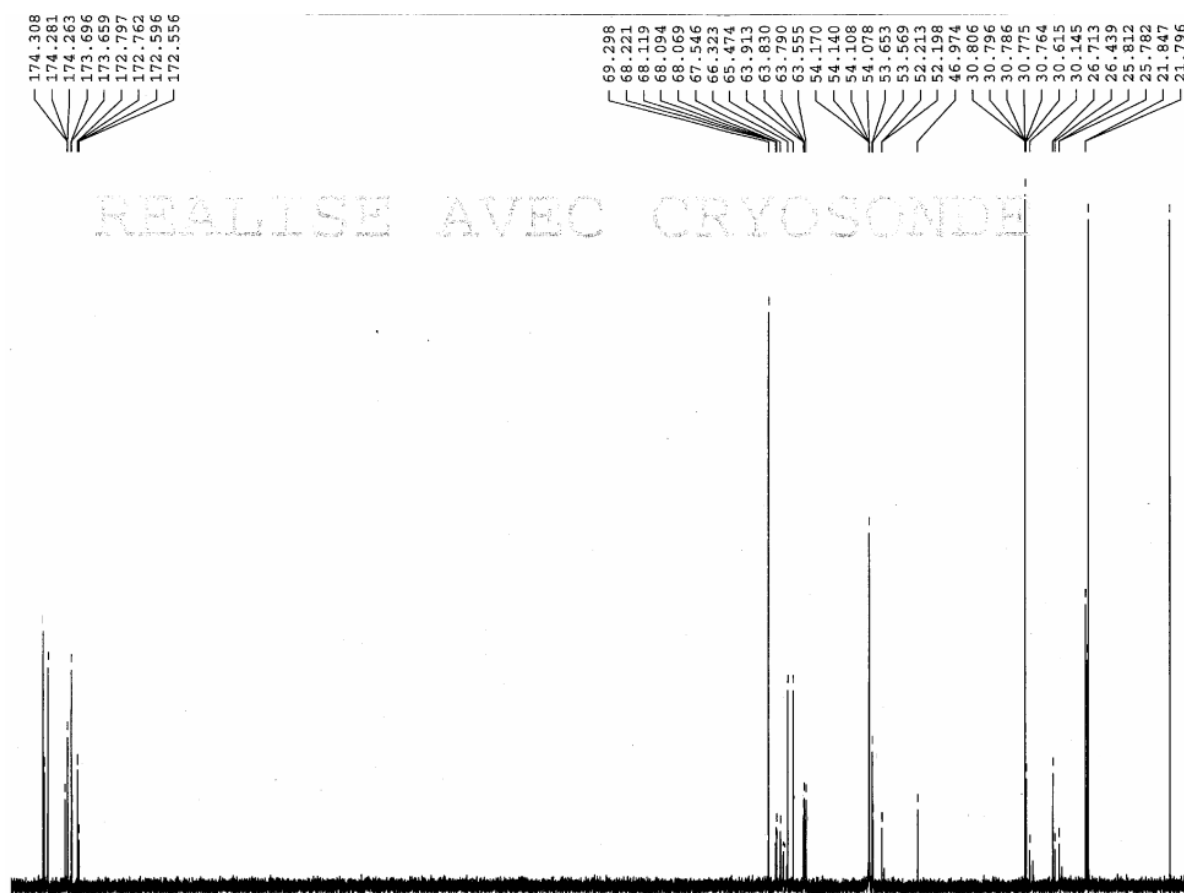


Figure A-8 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique

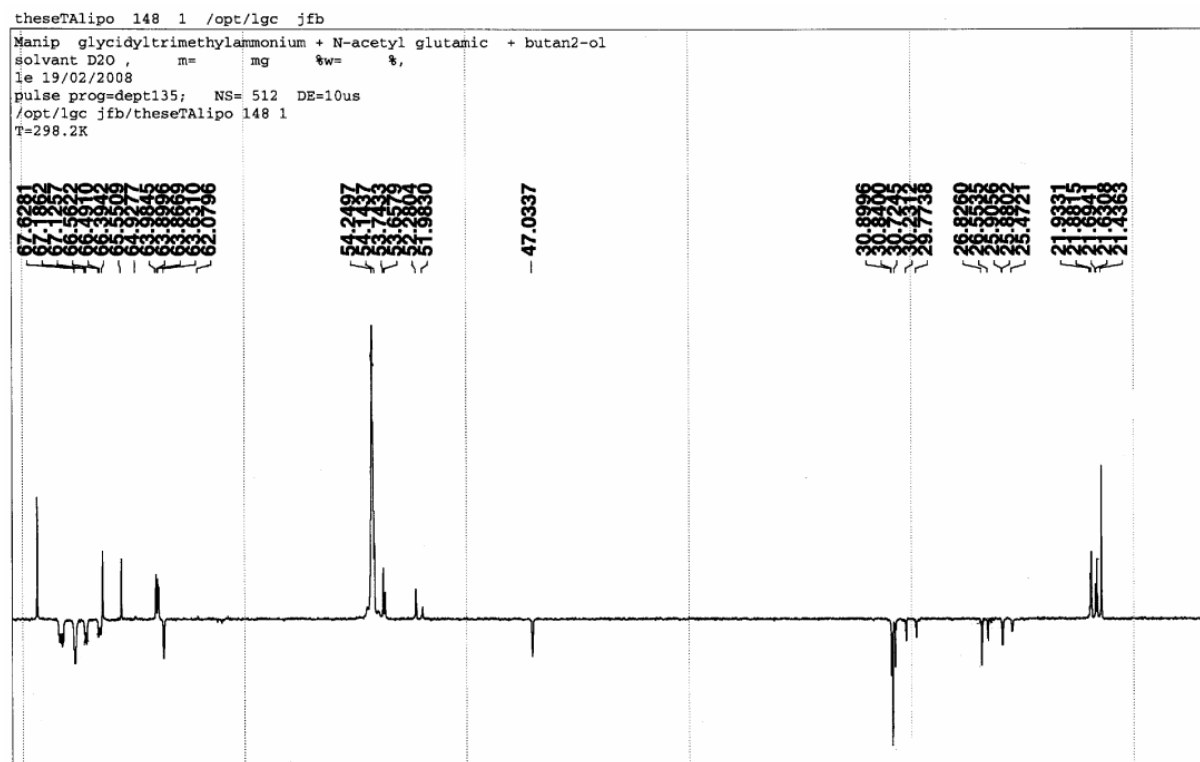
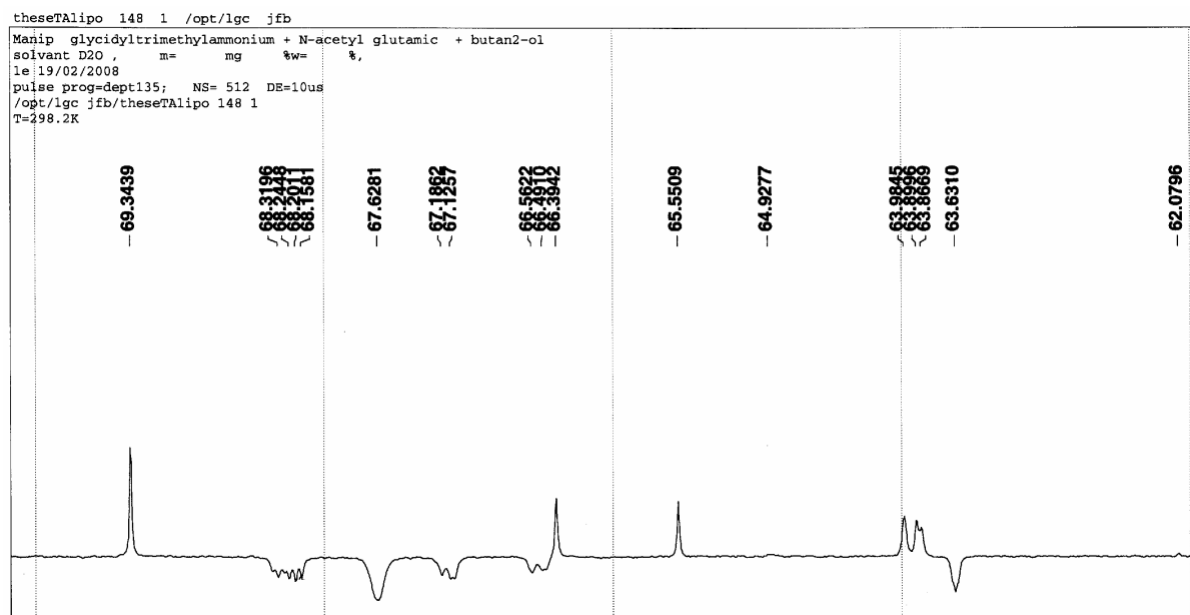


Figure A-9 : Spectre dept135 du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamiqueFigure A-10 : Zoom de 63 à 70 ppm du spectre dept135 du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique



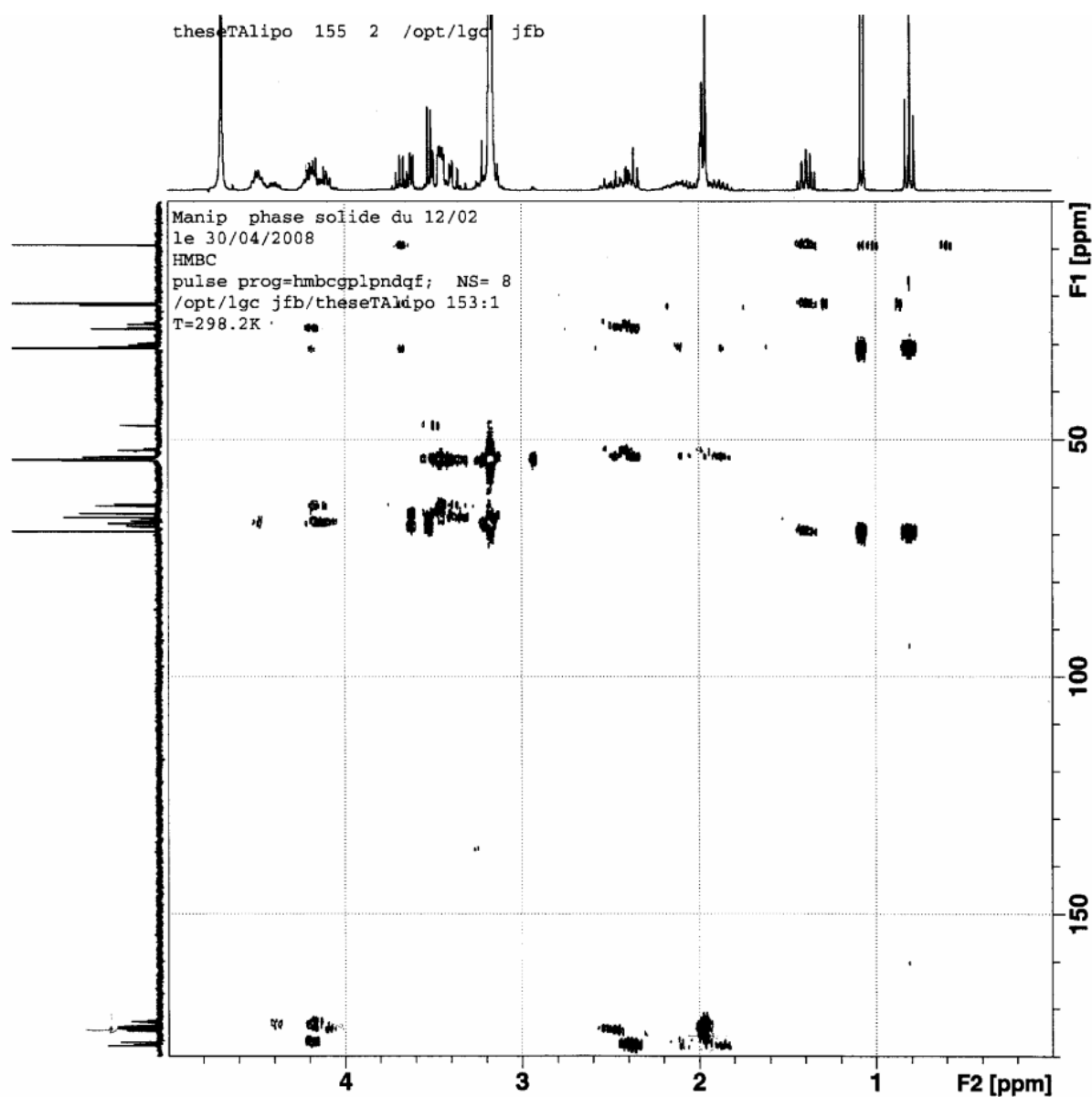
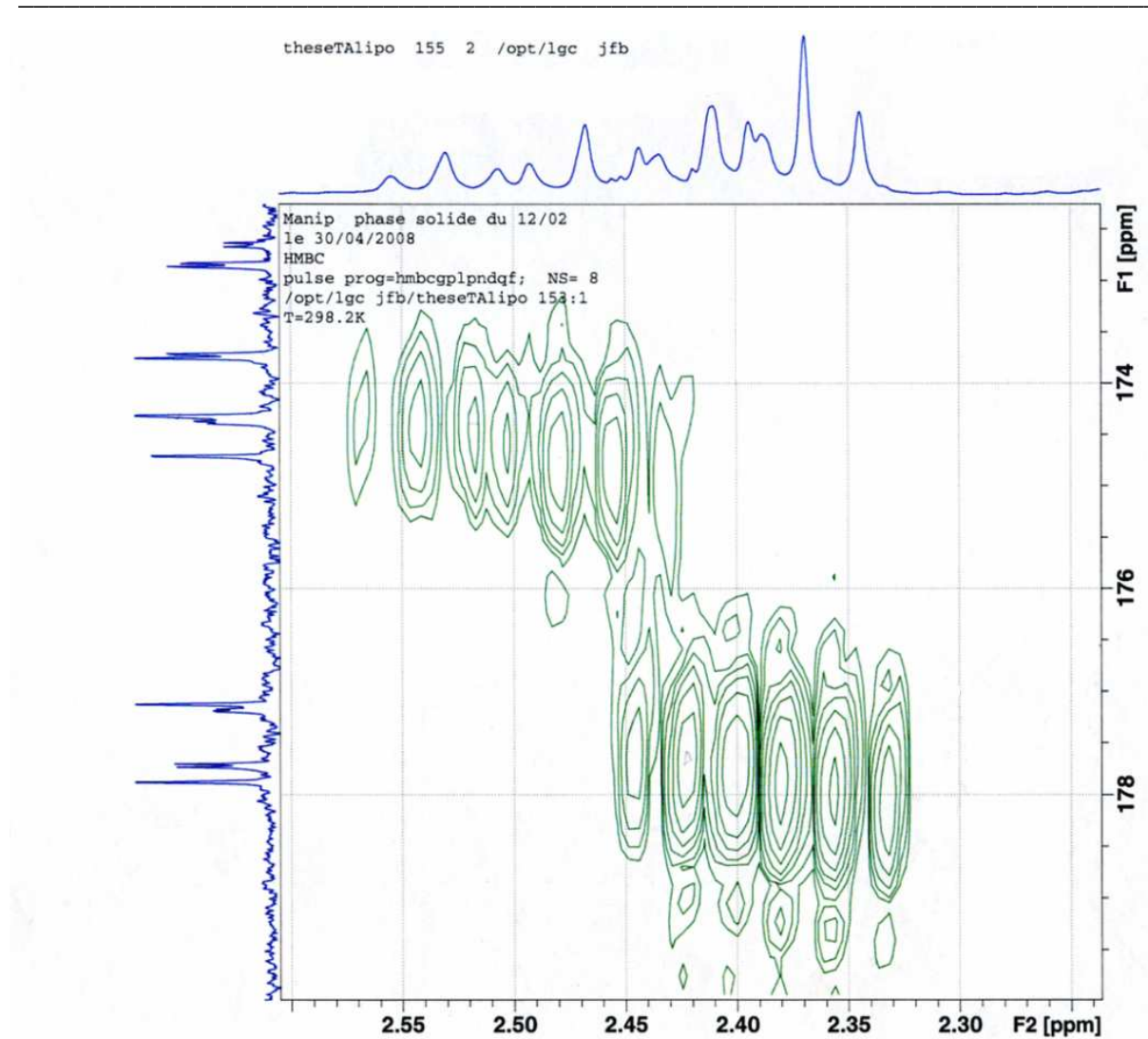


Figure A-11 : HMBC du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique



**Figure A-12 : Zoom de la zone 2,25 à 2,60 et 172 à 180 ppm du spectre HMBC du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique**

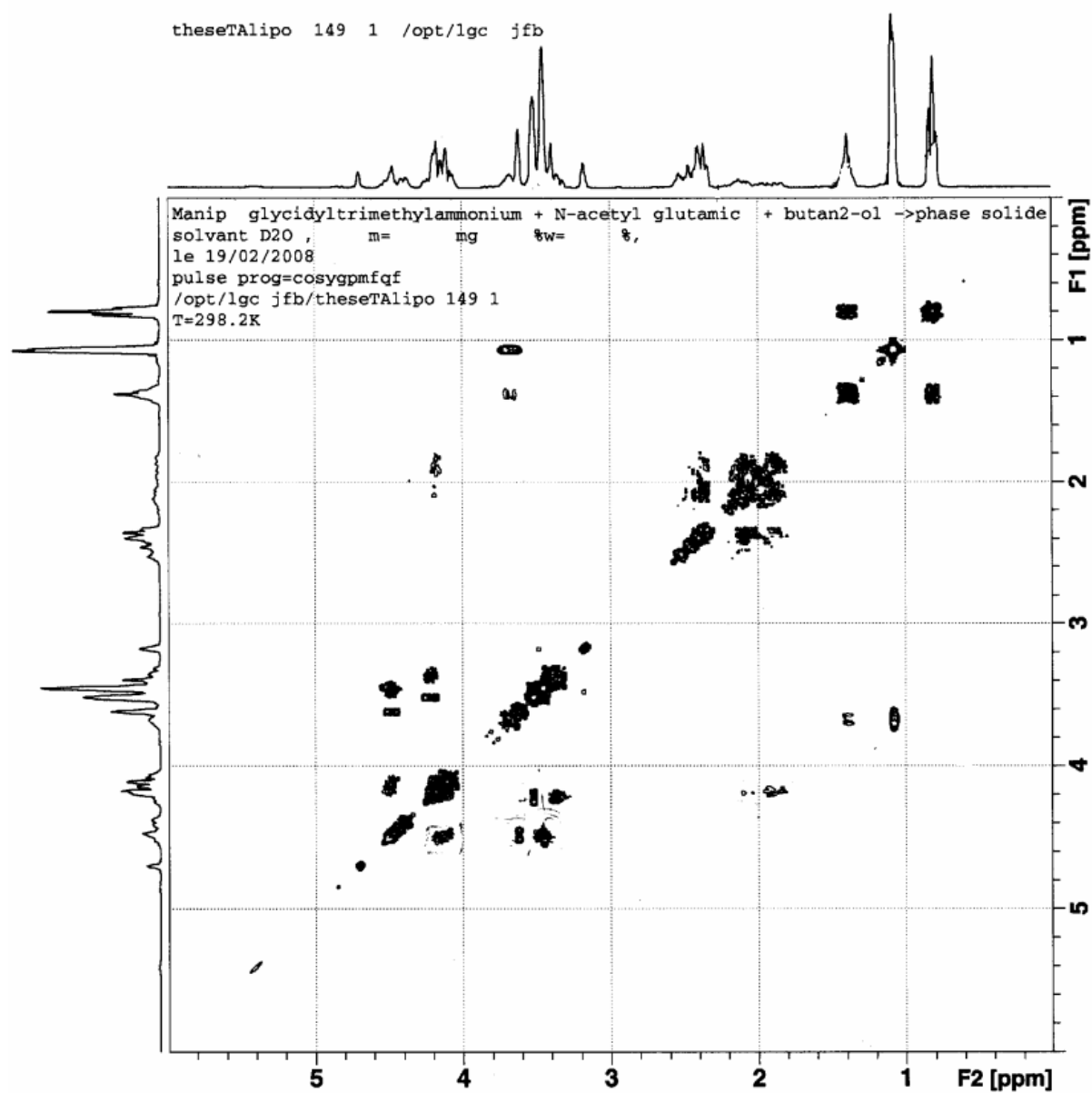


Figure A-13 : Spectre COSYDQF du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique

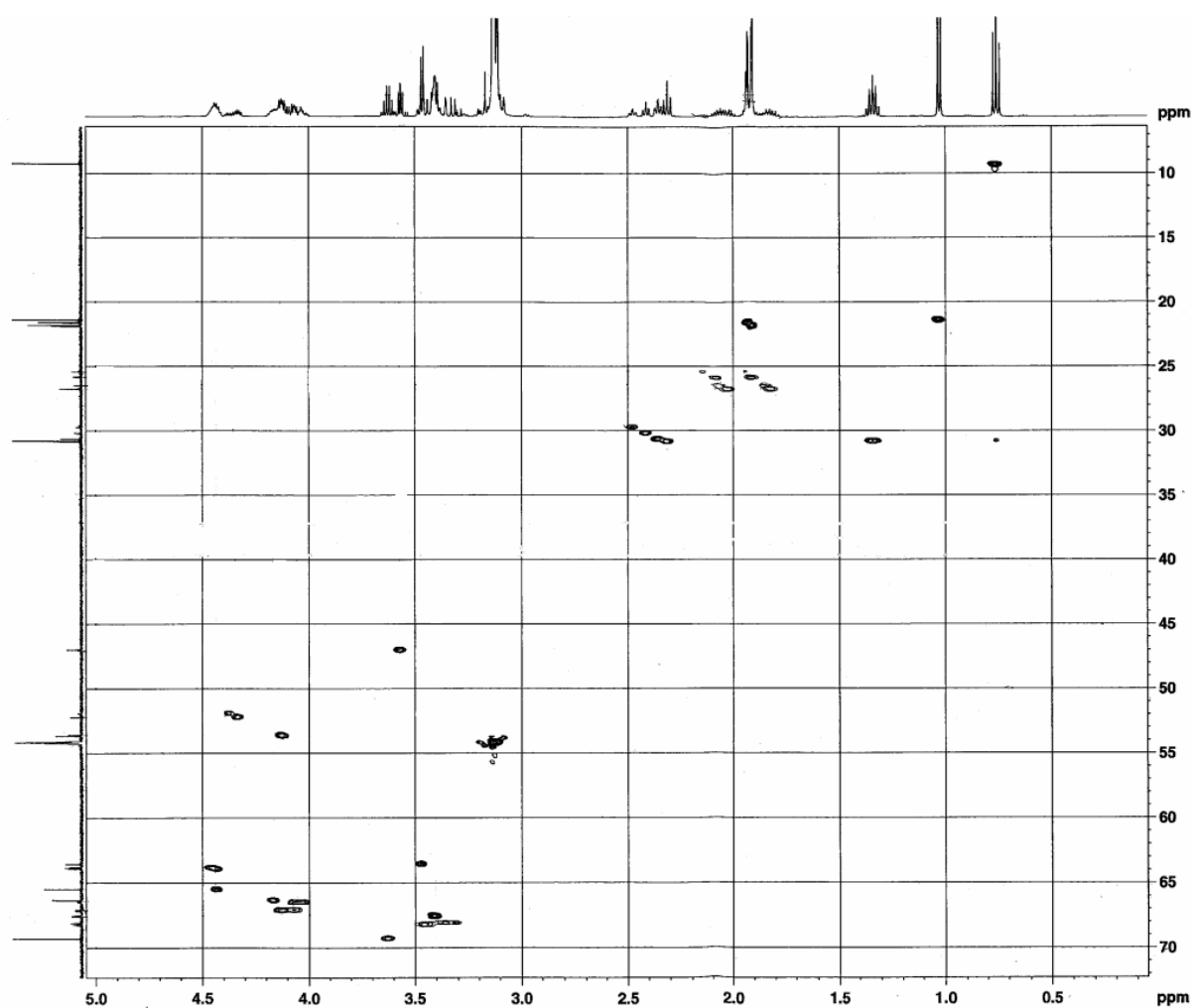


Figure A-14 : Spectre HSQC du mélange issu de la cationisation de l'acide *N*-acétylglutamique

## ABBREVIATIONS

$\eta_{AA}$  : taux de conversion de la réaction d'acylation par rapport aux acides aminés  
 $\eta_{ROCI}$  : taux de conversion de la réaction d'acylation par rapport aux chlorure d'acide  
Amb. : ambiante  
Arg : arginine  
APG : alkylpolyglucoside  
Boc : tert-butyl-oxycarbonyl  
CMC : concentration micellaire critique  
CMI : concentration minimale inhibitrice  
CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium  
Cbz : carbobenzyloxy  
d : doublet  
DCC : dicyclohexylcarbodiimide  
dd : doublet dédoublet  
DH : degré d'hydrolyse  
DMPL :  $N^{\alpha}, N^{\alpha}$ -diméthyl  $N^{\epsilon}$ -palmitoyllysine  
DMLL :  $N^{\alpha}, N^{\alpha}$ -diméthyl  $N^{\epsilon}$ -lauroyllysine  
DP : degré de polymérisation  
DTAB : bromure de dodécyltriméthylammonium  
DP : dodécylpyridinium  
E/S : ratio enzyme-substrat (en UA/g)  
FAO : Food and Agriculture Organisation  
GTA : glycidyltriméthylammonium  
IR : infrarouge  
LCP : longueur moyenne des chaînes peptidiques  
m : multiplet  
m l : multiplet large  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
R : rendement  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
s : singulier  
S : concentration en substrat (% massique)  
s l : singulier large

SDS : dodécylsulfate de sodium

t : triplet

T : température (°C)

THF : tétrahydrofurane

TMLL :  $N^\alpha, N^\alpha, N^\alpha$ -triméthyl  $N^\epsilon$ -lauroyllysine

TMPL :  $N^\alpha, N^\alpha, N^\alpha$ -triméthyl  $N^\epsilon$ -palmitoyllysine

TMS : tétraméthylsilane

TS : tension de surface



Les tensioactifs sont des produits chimiques largement utilisés dans le monde. Dans un contexte de développement durable, il est important de développer selon les principes de la chimie verte de nouvelles molécules amphiphiles issues de substances naturelles renouvelables. L'association d'un acide aminé ou d'un peptide et d'un composé à longue chaîne permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée.

Nous avons étudié et développé de nouveaux mélanges de tensioactifs obtenus à partir de protéines de pois. Dans une première étape, les protéines sont hydrolysées par l'Alcalase et la Flavourzyme à 50°C, pH 7,5, durant 30 min, afin d'obtenir des peptides de 3 à 5 acides aminés en moyenne qui constituent la partie hydrophile des tensioactifs. Puis, dans l'eau, la partie lipophile en C12 est greffée sur les fonctions amines libres avec un taux de 83% par une acylation de Schotten-Baumann, préalablement mise au point sur des acides aminés modèles. La CMC des formulations anioniques obtenues atteint 75 mg/L avec une TS de 28,4 mN/m (en comparaison aux 240 mg/L et 39,1 mN/m pour le SDS) ce qui leur confère des propriétés moussantes et émulsifiantes comparables voir supérieures aux tensioactifs pétrochimiques commerciaux. Enfin, ces mélanges sont cationisés par estérification des fonctions carboxylates à l'aide du chlorure de glycidyltriméthylammonium augmentant ainsi leur potentiel zêta de +70 mV. Les formulations ont alors des CMC de 90 mg/L et des TS de 32 mN/m.

Les deux nouvelles familles de tensioactifs naturels synthétisées présentent d'excellentes propriétés ce qui permet d'envisager leur utilisation comme une alternative « verte » dans de nombreux secteurs d'application.

---

Mots clés : protéines, chimie verte, enzymes, *N*-acylation, propriétés tensioactives, cationisation

---

The surfactants are chemical products widely used in the world. Within a context of sustainable development, it is important to develop, following the principles of green chemistry, new amphiphilic molecules from natural renewable materials. The association of an amino acid and a long chain compound allows obtaining molecules with a high surface activity.

We studied and developed new mixtures of surfactants obtained from pea proteins. In a first step, proteins are hydrolyzed by Alcalase and Flavourzyme at 50°C, pH 7.5, during 30 min, to obtain peptides with an average of 3 to 5 amino acids that constitute the hydrophilic part of surfactants. Then, the lipophilic part with 12 carbons is grafted on the free amine functions with a rate of 83% by a Schotten-Baumann reaction, in water. This reaction was developed with amino acids as a model. The CMC of the anionic formulations obtained reaches 75 mg/L with a ST of 28,4 mN/m (in comparison to 240 mg/L and 39.1 mN/m for the SDS) that gives foaming and emulsifying properties comparable or even better than petrochemical commercial surfactants. Finally, these mixtures are cationized by esterification of carboxylate functions with the glycidyltrimethylammonium chloride thus increasing their zeta potential of +70 mV. The formulations have a CMC of 90 mg/L and a ST of 32 mN/m.

Both synthesized new families of natural surfactants present excellent properties which permit to consider their use as a “green” alternative in numerous applications.